

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie**

**Biologický účinek rostlinných metabolitů II.
Izolace alkaloidů z *Eschschlozia californica*
Cham.**

(diplomová práce)

**Biological effect of plant metabolites II. Isolation
of alkaloids from *Eschscholzia californica* Cham.**
(diploma work)

Děkuji PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za odborné poradenství, aktivní vedení a za připomínky a rady při tvoření této práce. Také děkuji Doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi CSc, který přispěl nejen radami z oblasti alkaloidů. Poděkování si také zaslouží ostatní členové katedry farmaceutické botaniky a ekologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH:

I. ÚVOD.....	5
II. CÍL PRÁCE.....	7
III. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1. Botanická charakteristika.....	10
2. Chemická charakteristika.....	14
2.1. Izochinolinové alkaloidy.....	14
2.1.1. Benzofenantridinové alkaloidy.....	14
2.1.2. Morfinanové alkaloidy.....	21
2.1.3. Protoberberinové alkaloidy.....	23
2.1.4. Pavinové alkaloidy.....	26
2.2. Další alkaloidy.....	27
3. Biologická aktivita a klinické využití popsané v literatuře.....	29
4. Alzheimerova choroba.....	32
5. Separační a strukturně analytické postupy.....	35
5.1. Filtrace.....	35
5.2. Odpařování.....	35
5.3. Chromatografie.....	35
5.4. Adsorpční chromatografie.....	35
5.5. Gradientová eluce.....	36
5.6. Kolonová (sloupcová) chromatografie.....	36
5.7. Tenkovrstvá chromatografie.....	36
5.8. Krystalizace.....	36
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY.....	37
1. Potřeby.....	38
1.1. Přístroje.....	38
1.2. Nástroje.....	38
1.3. Chemikálie.....	39
1.4. Detekční činidla.....	39
1.5. Materiál.....	39
1.6. Zkratky.....	39
2. Postup práce.....	40
2.1. Původ drogy.....	40

2.2. Příprava primárního extraktu a jeho čištění.....	40
2.3. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu.....	40
2.4. Odstranění bazí pseudokyanidů z výtřepku A.....	40
2.5. Příprava kvartérních alkaloidů kyselých.....	41
2.6. Hledání správné vyvíjecí soustavy a detekčního činidla.....	43
2.7. Zkušební sloupcová chromatografie.....	44
2.8. Sloupcová chromatografie výtřepku J1 drogy <i>Eschscholzia californica</i>	45
2.8.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii.....	45
2.8.2. Příprava roztěru.....	45
2.8.3. Příprava sloupcové kolony.....	45
2.8.4. Průběh sloupcové chromatografie.....	45
2.8.5. Příprava vzorku k TLC a detekci.....	46
2.8.6. Uchování jednotlivých frakcí.....	46
2.9. Spojování frakcí.....	49
2.10. Výběr frakce.....	49
2.11. Čištění spojené frakce.....	50
2.11.1. Zkušební provedení TLC.....	50
2.11.2. Čištění.....	50
V. DISKUSE A ZÁVĚR.....	51
VI. PŘÍLOHY.....	54
VII. ABSTRAKT.....	58
VIII. LITERATURA.....	61

I. ÚVOD

Současná doba nám přináší prodloužení lidského života, což souvisí se změnou životního stylu, rychlým vývojem moderních diagnostických metod v medicíně a výzkumem nových léčiv ve farmacii, ale zároveň nám přináší zvýšené riziko výskytu degenerativních onemocnění především centrálního nervového systému jakou je Alzheimerova a Parkinsonova choroba. Alzheimerova choroba tvoří 50-60 % všech demencí. Současná medicína tuto chorobu nedovede účinně léčit, pouze poněkud zpomalit její postup. Při Alzheimerově chorobě dochází k ukládání patologických proteinů. Ty se ukládají jako vlákna nebo v okolí nervových buněk jako amyloidové plaky. Způsobují poškození a zánik nervových buněk a jejich spojů. Dochází k úbytku acetylcholinu, díky němuž dochází k nervovým vzruchům.

V mozkové kůře jsou při Alzheimerově chorobě pozorovány okrouhlé chomáče rozpadlých nervových vláken, v jejich středu se často objevuje hruška tvořená bílkovinou amyloidem. Hypotéza je taková, že amyloid poškodí výběžky nervových buněk. Mezi rizikové faktory vzniku Alzheimerovy choroby patří kromě vyššího věku, pohlaví ženy a celkového zdraví také kouření a konzumace alkoholu.

Naše katedra se rozhodla vyhledávat látky přírodního původu, které by mohly pomoci usnadnit léčbu této choroby, která komplikuje život nejen samotnému jedinci, ale i jeho okolí a je tudíž zatěžující pro celou společnost. Doposud nebyl nalezen účinný lék proti této nemoci a probíhá intenzivní výzkum látek umožňujících zpomalit její průběh, případně ho zcela zastavit.

Jako potenciálně využitelné látky k léčbě Alzheimerovy choroby se ukázaly inhibitory acetylcholinesterázy. Do této skupiny, mimo jiných látek izolovaných z rostlin, patří alkaloidy. Jedním z taxonů, který tento typ látek obsahuje, je taxon *Eschscholzia californica* z čeledi Papaveraceae.

II. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

1. zpracovat výtřepok J1, získaný ze suché nati s kořeny z rostliny *Eschscholzia californica* Cham.

- nalézt vhodnou dělicí soustavu pro chromatografický sloupec
- provést vlastní chromatografické dělení
- izolovat alespoň jeden čistý kvartérní alkaloid

2. provést identifikaci získaného alkaloidu

3. podílet se na stanovení aktivity izolovaného alkaloidu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze

III. TEORETICKÁ ČÁST

1. Botanická charakteristika



obr.1: *Eschscholzia californica* Cham.⁽¹⁾

Sluncovka kalifornská (latinský název *Eschscholzia californica*) se zařazuje do čeledi mákovitých (Papaveraceae). Rod *Eschscholzia* zahrnuje asi 125 druhů, které rostou zejména v západní části Severní Ameriky. Rozlišujeme dva poddruhy: subsp. *californica* a subsp. *mexicana*.

Je to státní symbol Kalifornie. Byla pojmenována Adalbertem von Chamisso na počest jeho přítele Johanna Friedricha Eschscholtze, lékaře a přírodovědce, který se v ruském Kotzebue zúčastnil expedice do Kalifornie.⁽⁴⁾

Eschscholzia californica je původní rostlina ze západního pobřeží Spojených států a je popsána ve flóře Nového Mexika, Arizony, Nevady a Utahu. Z těchto regionů se rozšiřuje do centrální Ameriky a Chile. Do Evropy byla dovezena v polovině 19. století jako okrasná rostlina. Místní názvy rostliny

(Kalifornia Poppy, Globe du Soleil, Dedal de oro) vycházejí z krémově zbarvených, oranžových a zlatožlutých květů této rostliny.

Přednostní lokalita je suchá písčovitá půda, ačkoli se může vyskytovat ve více vlhkých místech. Je to polymorfní druh se zajímavým ekologickým úspěchem: roste v nadmořských výškách 0-1900 (2000) m a v suchých klimatech je jednoletou bylinou, ale když roste v zónách deště a vlhkých půdách, stává se keřovitou a vytrvalou.⁽⁵⁾

Je to rostlina charakterizovaná modravě zelenými listy hluboce dělenými do lineárních segmentů a květy se čtyřmi opadavými okvětními lístky, které se zavírají za soumraku. Početné tyčinky obklopují opadavý jednopouzdrý semeník, přeměňující se v lineární tobolku, která se otvírá dvěma chlopněmi.⁽⁶⁾

Okvětní lístky (žádné jiné části rostliny) této odrůdy, jsou potravou pro larvy velkého počtu členů čeledi Noctuidae (Lepidoptera). Je známo, že rostlina je bohatým zdrojem izochinolinových alkaloidů. Předpokládá se, že tyto sloučeniny působí jako chemické bariéry pro jiné živočichy a naopak pro larvy této čeledi jsou vyhledávanou potravou.⁽⁷⁾

Základní charakteristiky sluncovky

Říše:	Planta	rostliny
Podříše:	Tracheobionta	vyšší rostliny
Nadoddělení:	Spermatophyta	semenné rostliny
Oddělení:	Magnoliophyta	krytosemenné
Třída:	Magnoliopsida	dvouděložné
Podtřída:	Ranunculidae	
Řád:	Papaverales	mákotvaré
Čeleď:	Papaveraceae Juss.	mákovité
Rod:	Eschscholzia Cham.	sluncovka
Druh:	<i>Eschscholzia californica</i> Cham.	sluncovka kalifornská
Poddruh	<i>Eschscholzia californica</i> Cham. ssp. <i>californica</i>	

Původ: Kalifornie

Dovoz do Evropy: polovina 19. století

Synonyma (Varietas): *Eschscholtzia californica*

Escholtzia californica

Eschscholzia crocea (Benth) Jeps.

Eschscholzia douglasii (Benth) A. Grey
Eschscholzia maritima (Greene) Jeps.
Eschscholzia peninsularis (Greene) Munz

Pojmenování: California Poppy (USA, kalifornský mák)
Kalifornisher Mohn (Ger., kalifornský mák)
Eschscholzie (Ger.)
Sluncovka kalifornská (Slov.)
Dedal de oro (Mex., zlatý náprstek)
Hierba del ferrocarril (Mex., plevel rostoucí podél trati)
Globe du Soleil (Fr.)
Pavot de Californie (Fr.)
Knipmutsje (Dá.)
Slaapmutsje (Dá.)
Amapola amarilla
Amapola de los indios
Copa de oro (Latinská Amerika)
Videshiposta (Indie)⁽⁸⁾

Životní cyklus: jednoletá až vytrvalá bylina

Výška: 20-80 cm

Tvar: trs

Lodyha: vzpřímená

Květ: dlouze stopkatý, oranžově-žlutý (zlatý, krémový), na bázi tmavší, jednoduchý, složený ze 4 korunních lístků 1-6 cm dlouhých

List: peřenodílný, chlupatý, barva stříbrná, šedá nebo zelená ⁽⁹⁾

Plod: tobolka 5 až 6 cm dlouhá

Droga: vysušená kvetoucí nadzemní část rostliny

Stanoviště: suché stráně, skály, pouštní oblasti, plné slunce

Doba kvetení: červen až říjen

Zajímavost: odpuzuje mandelinku bramborovou

Využití: Byla indiány tradičně využívána pro své uklidňující a uvolňující účinky. Také byla využívána při bolestech zubů (indiáni měli ve zvyku žvýkat její květ nebo použili latex), při úzkosti a zvýšeném psychickém napětí. Její účinky jsou podobné účinkům máku setého, ale jsou mírnější.

Rostlina není návyková, nehrozí vznik závislosti ani u dětí.

Využívá se kvetoucí nať a podává se nejčastěji ve formě tinktury, ze sušené natě se připravuje čaj. Nově se výtahy ze sluncovky objevují na trhu i ve formě kapslí a kapek. V homeopatii se používá celá rostlina v květu.



Rostlina patří mezi alkaloidní drogy, obsahuje převážně alkaloidy chemicky blízké opiovým alkaloidům.

Sluncovka kalifornská patří mezi rostliny, jejichž účinky se tradují již mnoho let, ale nebyly doposud plně vědecky potvrzeny. Odborný zájem o tuto drogu se začíná projevovat až v současné době.

Použití natě ze sluncovky je omezeno vyhláškou Ministerstva zdravotnictví a Ministerstva zemědělství č. 85/2008 Sb. ze dne 26. února 2008 o stanovení seznamu léčivých látek a pomocných látek, které lze použít pro přípravu léčivých přípravků. Nať z rostliny *Eschscholzia californica* je zařazena v příloze SEZNAM LÉČIVÝCH LÁTEK A POMOCNÝCH LÁTEK, KTERÉ SE POUŽÍVAJÍ PRO PŘÍPRAVU LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ této vyhlášky. Léčivé látky a pomocné látky, včetně tzv. rostlinných drog, jsou v tomto Seznamu uvedeny lékopisnými názvy.



Obr. 3: *Eschscholzia californica* Cham.⁽³⁾

2. Chemické složení

Složení drogy je dosti dobře známo, alespoň pokud jde o alkaloidy. Rod *Eschscholzia* obsahuje isochinolinové alkaloidy pavinového typu (hlavně eschscholzin a californidin), benzofenantridinového typu (sanquinarin, chelerytrin) a v menší míře některé protopinové deriváty. Nedávno byly detekovány a izolovány cheilantifolin, hunnemannin a norsanquinarin. Mezi flavonoidy byl dříve hlášen rutin. Dva nové isoflavony spolu s kvercetinem byly izolovány z celé rostliny. Mimoto byly z vodné frakce z květů izolovány flavonoly a anthokyanidy.⁽⁵⁾

Alkaloidy

Alkaloidy obecně jsou organické dusíkaté sloučeniny, které se vyskytují v určitých druzích rostlin, v nichž jsou biosyntetizovány z některých aminokyselin. Mohou také vznikat z meziproduktů biosyntézy terpenoidů, steroidů, některých kyselin nebo purinů, účinkem aminů a amoniaku. Jejich význam v rostlině je nejasný. Zřejmě poskytují ochranu před škůdci a hrají určitou roli při biosyntetických pochodech.

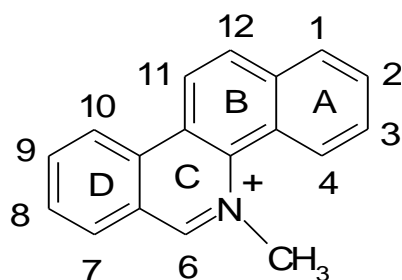
Alkaloidy jsou v rostlinné říši velmi rozšířené, nejsou však ubikvitární. Uvádí se, že dosud byly prokázány ve 186 čeledích. Ve 20 čeledích nebyly dosud dokázány a 153 čeledí nebylo dosud na alkaloidy testováno. Čeleď Papaveraceae patří k vysloveně alkaloidním čeledím - zahrnuje kolem 660 druhů, přičemž alkaloidy byly prokázány v 298 z nich. Celkem bylo z druhů této čeledi testováno 1309 alkaloidů převážně isochinolinového typu. V této čeledi jsou benzo[c]fenantridinové alkaloidy důležitým taxonomickým rysem.⁽¹⁰⁾

2.1. Izochinolinové alkaloidy

Izochinolinové alkaloidy jsou příbuzné chinolinovým alkaloidům a představují důležité oddělení rodiny alkaloidů. Izochinolinové alkaloidy mohou být rozděleny do několika podtříd a mezi dalšími zahrnují sloučeniny jako jednoduché izochinoliny, benzyloizochinoliny, ftalidoizochinoliny, protopiny, morfinany, protoberberiny a také ipecacuanové alkaloidy.⁽⁹⁾ Dalšími podtřídami jsou např. aporfiny a fenylethylisochinoliny.⁽¹²⁾

2.1.1. Benzofenantridinové alkaloidy

Kvartérní benzo[c]fenantridinové alkaloidy (KBA) jsou poměrně malou skupinou přírodních látek isochinolinového typu, které jsou na první pohled nápadné svým výrazným zbarvením. Dosud je jich známo 15 kromě artefaktů a syntetických derivátů.⁽¹¹⁾ Základem struktury kvartérních benzofenantridinů je N-methylbenzo[c]fenantridiniový kation (Obr. 4). Čtyři aromatické kruhy jsou označeny jako A, B, C, D. Dusíkový atom se nachází v pozici 5, nese methylovou skupinu a má pozitivní náboj. Vazba mezi atomem dusíku a C-6 se obvykle nazývá iminová vazba a je nejvíce reaktivní.⁽¹⁰⁾



Obr. 4: N-methylbenzo[c]fenanthridinový kation ⁽¹⁰⁾

Na základním tetracyklickém skeletu se nalézají různé kombinace methoxylové, methylendioxidové nebo hydroxylové skupiny. Podle typu substituce rozlišujeme čtyři podskupiny KBA:

- 2,3,7,8-tetrasubstituované alkaloidy jsou sanguinarin, chelerythrin, fagaridin a isofagaridin,
- 2,3,8,9-tetrasubstituované: nitidin, avicin a fagaronin
- pentasubstituované sanguilutin, sanguirubin, chelirubin, chelilutin, 10-hydroxysanguinarin a 10-hydroxychelerythrin
- hexasubstituované: makarpin a 12-hydroxychelirubin⁽¹³⁾

Kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy se vyskytují v řadě rostlinných druhů čeledi mákovitých (Papaveraceae), zemědýmovitých (Fumariaceae) a routovitých (Rutaceae). Jejich zastoupení v rostlinách kolísá od dominantních alkaloidů až po minoritní. Pravděpodobně nejbohatším zdrojem sanguinarinu je severoamerická bylina *Sanguinaria canadensis* L. Ta při poranění roní intenzivně červený latex, a proto je lidově nazývána krvavý kořen. Obsah KBA v oddencích dosahuje až 6% sušiny. Jediným našim (a evropským) druhem produkujícím sanguinarin ve větším množství je známá bylina vlaštovičník větší (*Chelidonium majus* L.). Celá rostlina je bohatě prostoupena mléčnicemi a při poranění roní hustý oranžový latex. Barva latexu je výsledkem kompozice červeného sanguinarinu, žlutého chelerythrinu a dvou protoberberinových alkaloidů, oranžového koptisinu a žlutého berberinu. Obsah KBA v kořeni vlaštovičníku je kolem 0,6% sušiny, v latexu je až 10x vyšší. Dalším významným zdrojem KBA je himalájská bylina *Dicranostigma lactuoides* Hook F. et Thomas obsahující až 4% KBA v suchém kořeni, oba druhy rodu *Macleaya*, tj. *M. microcarpa* Maxim. Fedde a *M. cordata* Willd. R. Br. rostoucí na Dálném Východě a u nás často pěstované jako dekorativní rostliny, a některé druhy rodu *Bocconia* ze Střední a Jižní Ameriky. Obecně platí, že obsah KBA v kořenech je podstatně vyšší (až o několik řádů) než v nadzemních částech rostliny. Alkaloidy typu nitidinu se nalézají pouze v čeledi Rutaceae.

Sanguinarin a chelerythrin, jediné komerčně dostupné KBA, byly objeveny v minulém století. Sanguinarin poprvé popsal James Dana roku 1827 jako hlavní barevnou složku *S. canadensis*. Čistý sanguinarin připravil poprvé Gadamer. Strukturu obou alkaloidů objasnili v roce 1931 rakouští chemici Ernst Spath a Fritéz Kuffer na základě chemické degradace. V letech 1954-1960

izolovali Slavík a Slavíková několik minoritních KBA: chelirubin a chelilutin z *Chelidonium majus* a ze *Sanguinaria canadensis* a kromě nich sanguilutin a sanguirubin ze *S. canadensis*. První polovina názvu odkazuje na rostlinný druh, druhá polovina je odvozena z latinského výrazu pro příslušnou barvu (luteus žlutý, ruber červený). Tři nové hydroxylové deriváty získali Tanahashi a Zenk z buněčných kultur *Eschscholzia californica* po aplikaci kvasinkového elicitoru, patogenního faktoru, který vyvolává obrannou reakci rostlinných buněk spojenou se zvýšenou biosyntézou KBA. Zcela nedávno zjistili Nakanishi a Suzuki na základě důkladných studií UV a NMR, že fagaridin má ve skutečnosti strukturu isofagaridinu. Látka fagaridin není považována za přírodní produkt.⁽¹³⁾

Izolace

Obecný izolační postup k získání frakce KBA může být popsán následujícím způsobem. Je typicky platný pro druhy s dominantním zastoupením KBA (např. *D. lactuoides*, *S. canadensis*). Rostlinný materiál je extrahován methanolem za horka, surový extrakt je po zahuštění rozpuštěn ve zředěné sírové kyselině. Kyselý filtrát je alkalizován roztokem Na_2CO_3 . Nelze použít NaOH, protože by došlo ke kontaminaci podílu bázemi kvarterních protoberberinů. Vzniklá sraženina volných bází alkaloidů je extrahována etherem. Organická fáze je oddělena, odpařena a krystalizována ve zředěné HCl. Chloridy KBA jsou v kyselém prostředí méně rozpustné než hydrochloridy ostatních, hlavně protopinových alkaloidů. Oddělená směs kvarterních chloridů je dále dělena kolonovou chromatografií na kyselém Al_2O_3 buď jako směs acetátů nebo chloridů. Alternativním způsobem dělení KBA je preparativní chromatografie s nepolárním sorbentem a vodnou mobilní fází. Tento postup nelze použít tam, kde jsou ve značné převaze alkaloidy tvořící téměř nerozpustný hydrochlorid, např. chelidonin v *Ch. majus*. Tam, i všude jinde, kde jsou KBA v malém množství, je nezbytné k jejich oddělení použít např. selektivní vysrážení kyanidovým aniontem.⁽¹³⁾

Chemické přeměny

Základním chemickým rysem KBA je citlivost k nukleofilnímu ataku na iminovou vazbu $\text{C}=\text{N}^+$. Tento proces je spojen s řadou nápadných změn. Kvarterní kation alkaloidu je barevný a ve vodě rozpustný, vzniklý adukt s trojvazným atomem dusíku je bezbarvý a ve vodě nerozpustný. V případě derivátů s charakterem aminoacetalů a aminalů je reakce v zásadě reversibilní, tzn. působením kyseliny na adukt vzniká opět barevná kvarterní sůl. Jiné deriváty, např. 6-kyan-dihydrobenzofenantridiny, jsou naopak značně odolné vůči kyselinám. V literatuře je řada informací o těchto derivátech a o okolnostech jejich vzniku, zejména o přeměnách s C-nukleofily (CN^- , Grignardova činidla, nitromethan, aceton, butanol, acetaldehyd). Naproti tomu jsou minimální údaje o reakcích s kyslíkatými, sirnými a dusíkatými nukleofily. Některé C-adenyly byly izolovány z rostlin a představují zajímavé přírodní produkty. Alkaloid nitrotyrasanguinarin izolovaný z *Hypecoum imberbe* je

jednou z mála přírodních nitrosloučenin. Předpokládá se, že vzniká oxygenací tyraminu a následnou adicí α -nitrokarbaniontu na iminovou vazbu sangiunarinu. Z druhů *Zanthoxylum* bylo izolováno několik neobvyklých derivátů chelerythrinu s různou uhlíkatou funkcí v poloze 6. Alkaloidy 6-methyldihydrochelerythrin a simulanochinolin obsahující 2-chinolinon byly nalezeny v *Z. simulans*. Tridekanonchelerythrin byl izolován ze *Z. integrifolium*. Atlanthoidin ze *Z. atlanthoides* obsahuje 4-kyanpyridin. Zpracováním kůry *Z. spinosum* byly objeveny 6 – karboxy - methyldihydro-chelerythrin, 6-(4-methyl-2-oxopentyl)-dihydrochelerythrin a chelelaktam s navázaným 2-pyrrolidonem. Kromě toho byl získán dimerní alkaloid kajmandimerin, v němž jsou dvě jednotky dihydrochelerythrinu spojeny formylmethylenovou skupinou.⁽¹³⁾

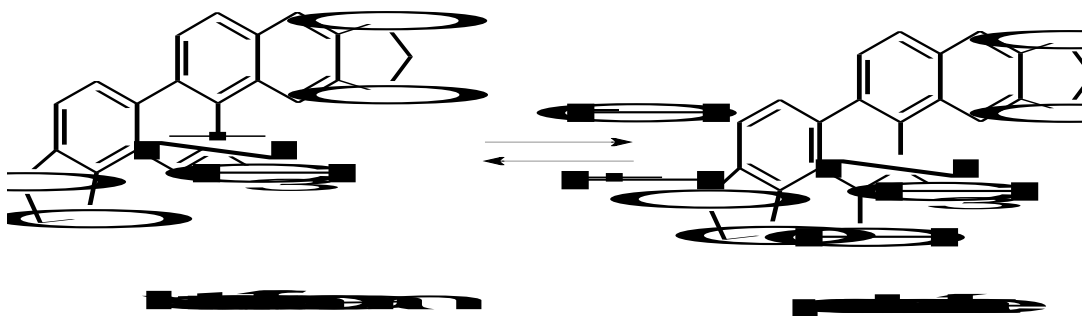
Struktura volných bází

Specifickou kapitolou v chemii KBA je tvorba volných bází. Pojem volná báze (free base) je v chemii alkaloidů univerzálně používán na označení produktu bazického charakteru, který vznikl alkalizací soli alkaloidu a v kyselém prostředí poskytuje opět sůl (Obr. 5). Citlivost na míru alkalizace je dána hodnotou pH amoniové soli a závisí na chemické povaze alkaloidní struktury. Volné báze alkaloidů se nemohou vyskytovat v rostlinných tkáních pro jejich více či méně kyselou reakci, a proto je můžeme považovat za svého druhu artefakty.

Existují dva způsoby, jak připravit volné báze KBA:

1) Sůl KBA je rozpuštěna ve vodě a roztok je zalkalizován Na_2CO_3 . Bílá sraženina báze je oddělena, promyta vodou a usušena. Tato metoda zaručuje velmi dobrý výtěžek s minimálními ztrátami, poskytuje však amorfni produkt. Předpokladem je vysoce čistá kvartérní sůl alkaloidu.

2) Elegantnější alternativou je extrakce sraženiny báze do nepolárního rozpouštědla. Používá se přednostně diethylether, možno použít i benzen či jiná uhlovodíková rozpouštědla. Nevhodný je chloroform (zbytky kyselin rozkládají báze) či vyšší alkoholy (riziko chemických přeměn). Organická fáze je oddělena a zahuštěna ke krystalizaci. V tomto případě jsou báze KBA získány jako bezbarvé krystaly s vyšší a ostřejší teplotou tání, ale výtěžek je zpravidla nižší, než v první metodě. V některých případech byl pozorován vznik vedlejších produktů dosud nezjištěné konstituce.⁽¹³⁾



Obr. 5: Strukturní formy kvartérních benzofenantridinových alkaloidů⁽⁸⁾

Biologická aktivita

O významných biologických účincích benzofenantridinů svědčí jejich obsáhlé využití v tradiční lidové medicíně, které má více jak stoletou tradici. Extrakt z *Chelidonium majus* byl již od starověku používán k léčbě bradavic, hemoroidů a artritidy. Dodneška využívají některé africké kmeny žvýkání tyčinek z kořenů *Fagara zanthoxyloides*, kde je hlavním alkaloidem chelerythrin, k péči o své zuby.⁽¹⁰⁾

Biologická aktivita KBA je velmi různorodá. Je třeba rozlišit skupinu sanguinarinu a skupinu nitidinu. Sanguinarin a chelerythrin vykazují zřetelný antimikrobiální, antimykotický, antiplakový a protizánětlivý účinek. Kombinace těchto aktivit je výhodná zejména pro stomatologické aplikace v léčbě a prevenci zánětlivých onemocnění parodontu. Originální český výrobek SANTOIN (zubní pasta, ústní voda) obsahuje směs sanguinarinu a chelerythrinu z *Macleaya cordata* a je patentově chráněný. V Rusku je podobná směs pod názvem SANGUIRITRIN užívaná zevně jako antimikrobiální přípravek a vnitřně při myopatiích a následcích obrny (inhibice acetylcholinesterázy). Vhodnost perorální aplikace těchto alkaloidů je problematická vzhledem k prokázané hepatotoxicitě sanguinarinu. Chelerythrin je v současné době studován jako selektivní inhibitor proteinkinázy C. Alkaloidy nitidin a fagaronin vykazují naproti tomu určité antileukemické aktivity a nemají účinky sanguinarinu.⁽¹³⁾

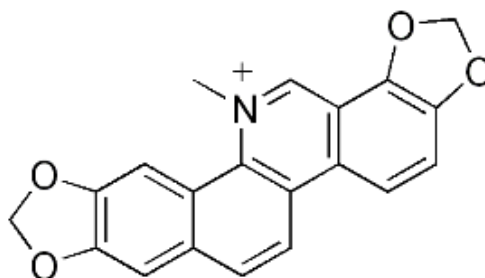
Sanguinarin

Sanguinarin je toxický alkaloid extrahovaný z několika rostlin, včetně krvavěnky kanadské (*Sanguinaria canadensis*), *Agremone mexicana*, *Chelidonium majus* a *Macleaya cordata*. V rostlinách je syntetizován z dihydrosanguinarinu pomocí působení enzymu dihydrobenzofenantridin-oxidázy⁽¹⁴⁾

Sanguinarin má antimikrobní, antifungální a protizánětlivé vlastnosti. Inhibuje Na/K-dependentní ATPázu, má pozitivní inotropický účinek a interaguje s nukleovými kyselinami. Chlorid sanguinarinu se používá v ústních vodách a zubních pastách hlavně v USA: pomocí selektivní vazby na plak inhibuje při

koncentracích okolo 1 – 16 µg/ml 98% bakterií (aktivita srovnatelná s aktivitou chlorhexidinu).⁽⁶⁾

Toxicita sanguinarinu: Několik studií připisuje vysoký výskyt chronických glaukomů s širokým úhlem spojených s otoky, které byly dříve zaznamenány v Indii, kontaminaci jedlých olejů rostlinou *Agremone* z čeledi Papaveraceae bohaté na sanguinarin. Následně však další autoři zpochybnili tyto závěry. Navíc se ukázalo, že LD₅₀ chloridu sanguinarinu na krysách je 1,66g/kg (per os) a denní dávka 0,6mg/kg sanguinarinu po 30 dní pravděpodobně nemá na krysy vliv. Intravenózní toxicita je mnohem větší (29 mg/kg).⁽⁴⁾ Když se sanguinarin aplikuje na pokožku, ničí buňky a tkáně. Následně mohou krvavé rány produkovat mohutné strupy nazývané *eschar*. Z tohoto důvodu se sanguinarin nazývá jako escharotický.⁽¹⁴⁾



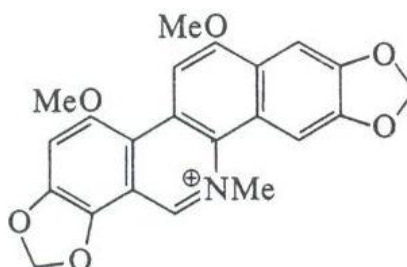
Obr.6: Struktura sanguinarinu⁽³⁰⁾

M_w: 332,34

T_f: 266,7°C

Makarpin

Alkaloid izolovaný z *Eschscholzia douglasii*, *E. loggii*, *E. glauca*, *Macleaya cordata*, *M. microcarpa* a *Stylophorum diphyllum*.⁽¹⁶⁾ Makarpin lze používat při vyšetření krve. Podobně jako další alkaloidy totiž fluoreskuje, rychle proniká do jádra buněk, naváže se na DNA i RNA, které je tvoří, a rozpozná bílé a červené krvinky, jejich kvalitu či množství. Určí i to, zda se jednotlivé buňky rozmnožují. Díky tomu by se mohla urychlit a zjednodušit vyšetření pacientů s leukémií a nádorovými onemocněními.⁽¹⁶⁾



Obr.7: Struktura makarpinu⁽¹⁸⁾

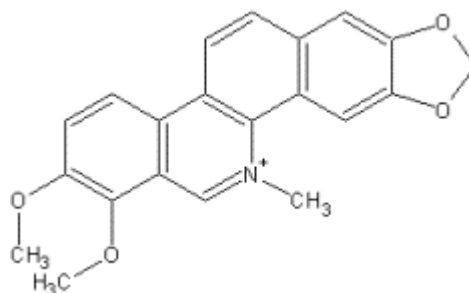
M_w: 392,387

T_f: 283-285°C⁽¹⁷⁾

Chelerythrin

Alkaloid obsažený v široké paletě druhů z čeledi Papaveraceae (*Agremone*, *Bocconia*, *Chelidonium*, *Hunnemannia*, *Eschscholzia*, *Glaucium*,

Dicranostigma, *Hylomecon*, *Hypecoum*, *Macleaya*, *Papaver*, *Platystemon*, *Sanguinaria*, *Stylomecon*, *Stylophorum*), Rutaceae (*Fagara*, *Toddalia*, *Zanthoxylum*), Fumariaceae (*Corydalis*, *Dicentra*) a Sapindaceae (*Pteridophyllum*). Antimikrobiální a protizánětlivá aktivita doporučuje použití proti ústním infekcím. Je to inhibitor aminotransferáz z krysích jater. Má dočasné hypertenzní účinky na myši, králíky a kočky. Působí analgeticky a prodlužuje spánek. Je silnou cytotoxickou látkou, působí interkalaci DNA a odpojení při oxidativní fosforylaci.⁽¹⁸⁾



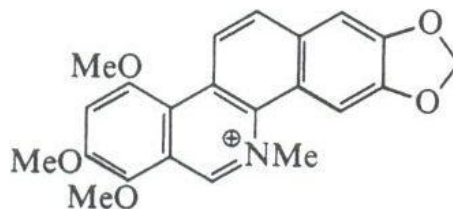
Obr.8: Struktura chelerythrinu⁽³¹⁾

M_w: 348,38

T_f: 282-283°C⁽¹⁶⁾

Chelilutin

Alkaloid izolovaný z různých druhů čeledi Papaveraceae (*Chelidonium*, *Eschscholzia*, *Glaucium*, *Hunnemannia*, *Hylomecon*, *Macleaya*, *Sanguinaria*) a Fumariaceae (*Dicentra*).⁽¹⁸⁾



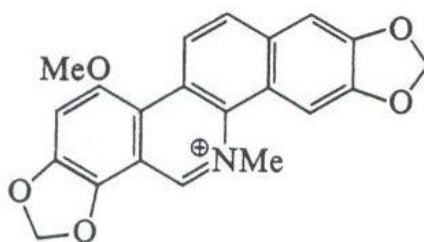
Obr.9: Struktura chelilutinu⁽¹⁸⁾

M_w: 394,45

T_f: 229-230°C⁽¹⁷⁾

Chelirubin

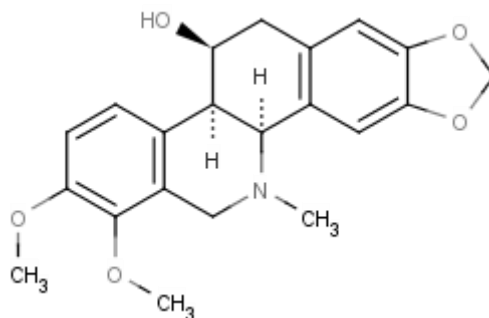
Alkaloid izolovaný z čeledi Papaveraceae (*Bocconia*, *Chelidonium*, *Dicranostigma*, *Eschscholzia*, *Glaucium*, *Hunnemannia*, *Hylomecon*, *Hypecoum*, *Macleaya*, *Papaver*, *Platystemon*, *Sanguinaria*, *Stylophorum*) a Fumariaceae (*Dicentra*).⁽¹⁸⁾



Obr.10: Struktura chelirubinu⁽¹⁸⁾

M_w: 352,37
T_f: 257-258°C⁽¹⁷⁾

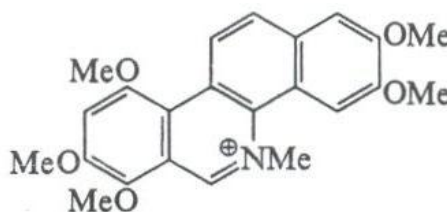
α-homochelidonin



Obr. 11: Struktura α-homochelidoninu⁽³⁴⁾

M_w: 369,42
T_f: 182°C⁽¹⁷⁾

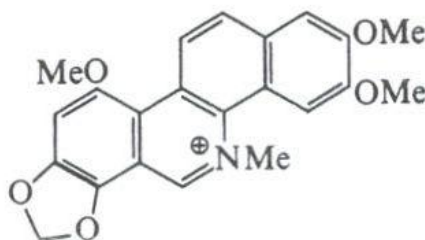
Sanguilutin



Obr. 12: Struktura sanguilutinu⁽¹⁸⁾

M_w: 394,446
T_f: 253-254°C⁽¹⁶⁾

Sanguirubin



Obr. 13: Struktura sanguirubinu⁽¹⁸⁾

M_w: 378,4
T_f: 252-253°C⁽¹⁷⁾

2.1.2. Morfinanové alkaloidy

Morfin

Morfin, také morfium, je alkaloid morfinanového typu, obsažený v opiu. Tvoří přibližně 10 % hmotnosti surového opia.

Používá se primárně v lékařství jako silné analgetikum a též jako surovina na výrobu dalších opioidů morfinového typu (například kodeinu, ethylmorfinu, hydromorfonu, diamorfinu - známého spíše jako heroin - a

folkodinu. Je prototypem silných analgetik (anodyna), taktéž i referenční látkou, k níž se vztahuje účinnost ostatních opioidů. Jeho účinky na organismus i psychiku vyplývají z jeho působení na opioidní receptory především v centrální nervové soustavě. Při užívání se rychle rozvíjí tolerance. To znamená, že k dosažení stejné účinnosti je třeba podávat stále vyšší dávky. S tím souvisí i jeho silná návykovost. Morfin je omamná látka a kromě svého použití v medicíně je též zneužíván jako droga nebo surovina k výrobě heroinu. Podléhá proto zvláštnímu pravidlům zacházení při výrobě, distribuci a ve zdravotnických zařízeních.

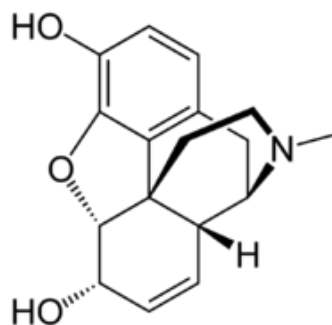
V čisté podobě tento alkaloid jako první izoloval lékárník Friedrich Sertürner roku 1804, který mu dal jméno „morphium“. To vychází z řecké mytologie – Morpheus byl bohem snů. Název morfium byl později změněn na morfin. Přípona -in je jednotně používána při vytváření názvů alkaloidů.

V lidském organismu působí především v centrálním nervovém systému. Má plně agonistický účinek na opioidní receptory typu μ , tyto receptory jsou po navázání morfinu plně aktivovány. Dalšími receptory, na které se morfin váže, jsou opioidní receptory typu κ a δ , na kterých působí rovněž agonisticky, avšak méně výrazně. Jedná se o stejné receptory, na které se v organismu váží tzv. endorfiny a enkefaliny – látky přirozeně tlumící bolest. Klinické účinky morfinu jsou: analgetický, antinocicepční (tlumení nepříjemných vjemů), sedativní, anxiolytický, euforizující (zlepšení nálady), ale i dysforizující (zhoršení nálady), snížení citlivosti dechového centra na oxid uhličitý a následný útlum dýchání, antitusický (útlum reflexu kašle), mióza (zúžení očních zornic, typické pro účinek opioidů), snížení reaktivity termoregulačních center v CNS, nevolnost a zvracení – dráždí tzv. chemorecepční centra v area postrema v prodloužené míše, při pravidelném podávání časem ustupuje až mizí.

Periferní účinky morfinu jsou: zácpa, útlum peristaltiky střev, uvolnění histaminu z mastocytů - vede společně s dalšími mechanismy k vazodilataci, zvýšenému prokrvení kůže, u citlivých jedinců k hypotenzi a případně bronchospasmu, zvýšení napětí až křečím hladkého svalstva svěračů trávicího ústrojí a močových cest. Morfin má také účinky na imunitní systém a další systémy organismu, jejich význam je ovšem z hlediska okamžitých účinků méně významný než účinky centrální a muskulotropní.

Použití: Obvykle se podává morfin k tlumení akutních i chronických nesnesitelných bolestí po úrazech, chirurgických operacích, infarktu myokardu. Rovněž se používá při předoperační přípravě. Tlumivého účinku na dýchací centrum lze využít při otoku plic k odstranění neekonomické hyperventilace (nadměrně zrychleného dýchání) a tíživého pocitu dušnosti.

V současnosti se již zřídka používá při těžkém, neztišitelném kašli při zhoubných onemocněních dýchacích cest (neúčinkuje-li kodein dostatečně).⁽¹⁹⁾



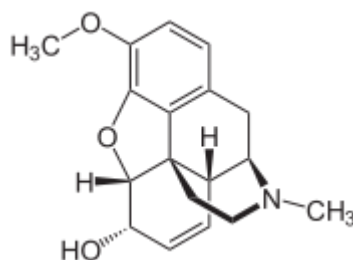
Obr.14: Struktura morfinu⁽¹⁹⁾

M_w : 285,35

T_f : 253-254°C⁽¹⁷⁾

Kodein

Kodein je opiát používaný pro své analgetické, antitusické a protiprůjmové schopnosti. Je to nejpoužívanější opiát na světě. Je jedním z neúčinnějších ústně podávaných opioidních analgetik a má širokou míru bezpečnosti. Poprvé byl izolován v roce 1832 Pierrem Jeanem Robiquetem (1780-1840) jako nečistota vyskytující se ve vārce morfinu. V surovém opiu se tento alkaloid nachází v koncentracích od 0,7 do 2,5 %. Přestože se samostatně vyskytuje v přírodním stavu, většinou se získává z morfinu.⁽²⁰⁾



Obr.15: Struktura kodeinu⁽²⁹⁾

M_w : 299,37

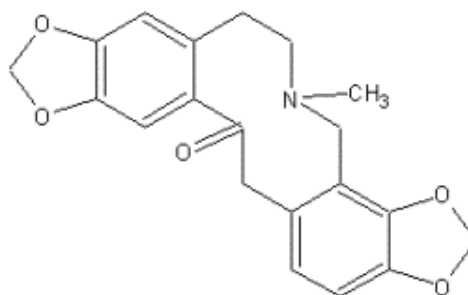
T_f : 155°C

2.1.3. Protoberberinové alkaloidy

Protoberberinové alkaloidy, např. protopin a allokryptopin, patří k nejrozšířenějším alkaloidům v rostlinách, zejména v čeledi mákovité (Papaveraceae). V poslední době je zvýšený zájem o protopin z hlediska farmakologie pro jeho příznivé účinky na kardiovaskulární systém a antitrombotickou aktivitu. Na rozdíl od ostatních typických alkaloidů existuje u protopinu zásadní rozdíl ve struktuře volné báze a soli. Báze protopinu je tricyklická s oxoskupinou zatímco soli mají tetracyklickou konstituci s hydroxylovou skupinou. V roztoku existují soli jako směs cis/trans izomerů vzhledem k poloze -OH a -CH₃ skupiny. Byla připravena řada solí protopinu a allokryptopinu, jejich struktura byla studována pomocí rentgenostrukturní analýzy, NMR a kvantově chemických metod.⁽²¹⁾

Protopin

Alkaloid obsažený v široké paletě druhů z čeledi Papaveraceae (*Agremone*, *Bocconia*, *Chelidonium*, *Hunnemannia*, *Eschscholzia*, *Glaucium*, *Hylomecon*, *Hypecoum*, *Maceaya*, *Meconella*, *Meconopsis*, *Papaver*, *Roemeria*, *Romneya*, *Sanguinaria*, *Stylomecon*), Fumariaceae (*Corydalis*, *Dicentra*, *Fumaria*) a Sapindaceae (*Pteridophyllum*). Vykazuje slabou spasmolytickou aktivitu, slabou stimulaci hladkých svalů a slabou protinádorovou aktivitu. U zvířat dilatuje koronární cévy. Je sedativní, má baktericidní účinky.⁽¹⁸⁾



Obr.16: Struktura protopinu⁽³⁴⁾

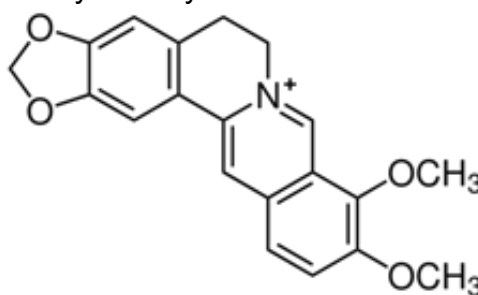
M_w: 353,38

T_f: 206-207°C⁽¹⁷⁾

Berberin

Berberin se nachází se v rostlinách jako *Hydrastis canadensis* a *Coptis chinensis*, obvykle v kořenech, oddencích, stoncích a kůře. Je silně žlutě zabarven, proto se dříve rostlina *Hydrastis canadensis* používala k barvení vlny, kůže a dřeva. V severní Indii je vlna i dnes barvena berberinem.

Jako léčivo má berberin aktivitu proti houbovým infekcím, kandidám, kvasinkám, parazitům a bakteriálním a virovým infekcím. Berberin je považován za neúčinné antibiotikum, ale ve směsi s dalšími biochemickými látkami z *Hydrastis canadensis* může být účinný.⁽²²⁾

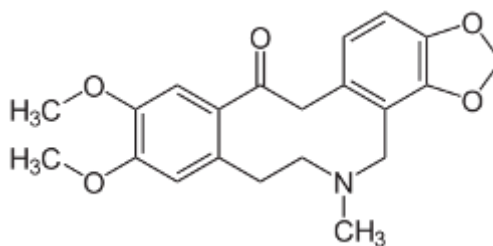


Obr.17: Struktura berberinu⁽³²⁾

M_w: 336,37

T_f: 205-207°C⁽¹⁷⁾

Kryptopin



Obr.18: Struktura kryptopinu⁽³³⁾

M_w: 369,42

T_f: 280°C⁽¹⁷⁾

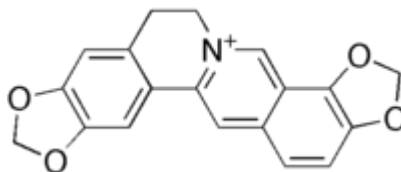
α-alkokryptopin

M_w: 369,42

T_f: 159-160°C⁽¹⁷⁾

Koptisin

Koptisin je alkaloid nalezený v *Coptis chinensis*. Droga je oblíbená pro svou hořkou chuť a je používána v tradiční čínské medicíně k léčení trávicích potíží způsobených bakteriálními infekcemi.⁽²³⁾



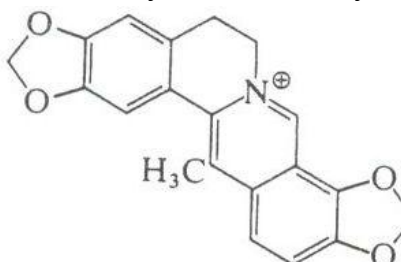
Obr.19: Struktura koptisinu⁽²³⁾

M_w: 320,33

T_f: 280°C⁽¹⁷⁾

Corysamin (13-methylkoptisin)

Alkaloid nacházející se v rostlinách *Corydalis incisa*, *C. cava*, *C. lutea*, *Meconopsis napaulensis*, *Papaver*, *Glaucium*, *Agremone*, *Eschscholzia* a *Bocconia* sp. Je schopen inhibovat enzym alkoholdehydrogenázu.⁽¹⁸⁾

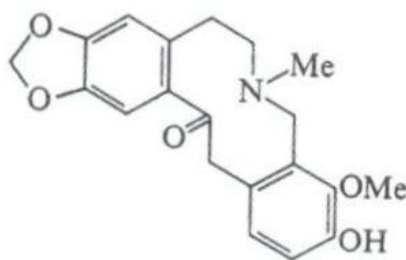


Obr. 20: Struktura corysaminu⁽¹⁸⁾

M_w: 334,36

T_f: 300°C⁽¹⁷⁾

Thalictrisin⁽¹⁸⁾



Obr.21: Struktura thalictrisinu⁽¹⁸⁾

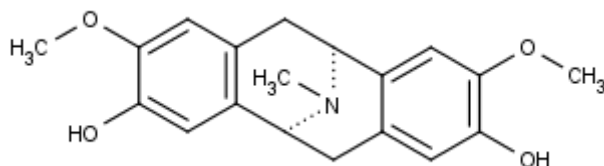
M_w: 355,39

T_f: 261-263°C⁽¹⁷⁾

2.1.4. Pavinové alkaloidy

Bisnoragremonin

Alkaloid je získaný z nadzemních částí rostlin *Agremone hispida* a *A. munita* var. *Rotunda*, kořenů *Thalictrum dasycarpum*, *Eschscholzia californica*, *E. douglasii* a *E. glauca*, a listů stonků a kořenů rostliny *Cryptocarya longifolia* (Papaveraceae, Ranunculaceae, Lauraceae).⁽¹⁸⁾



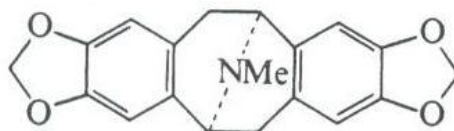
Obr.22: Struktura bisnoragremoninu⁽³⁴⁾

M_w: 327,39

T_f: 254°C⁽¹⁷⁾

Eschscholtzin a eschscholtzin-N-oxid

Vysušené a rozemleté korunní lístky *Eschscholzia californica* poskytly surový alkaloidní extrakt. Chromatografie extraktu na sloupci obsahující silikagel a rozsáhlá TLC frakcí pozitivně reagujících na Dragendorfovo činidlo vedly k izolaci eschscholtzinu, nacházejícím se původně ve směsi nadzemních částí této rostliny, a dalšího alkaloidu identifikovaného jako dříve nepopsaný eschscholtzin-N-oxid.⁽²⁴⁾



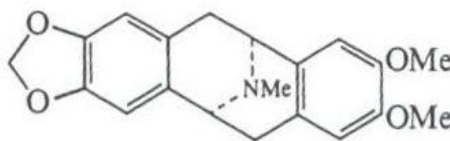
Obr.23: Struktura eschscholtzinu⁽¹⁸⁾

M_w: 323,35

T_f: 128°C⁽¹⁷⁾

Eschscholzin

Alkaloid z *Eschscholzia californica* a z plodů a vrcholů rostliny *Thalictrum revolutum* (Papaveraceae). Má slabou antimikrobiální aktivitu⁽¹⁸⁾.



Obr. 24: Struktura eschscholzinu⁽¹⁸⁾

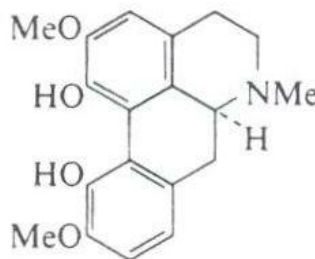
M_w: 339,4

T_f: 180°C⁽¹⁷⁾

2.2. Další alkaloidy

Korytuberin

Aporfinový alkaloid izolovaný z různých druhů čeledi Fumariaceae (*Corydalis*, *Dicentra*), Papaveraceae (*Glaucium*, *Papaver*, *Dicranostigma*, *Eschscholzia*), Lauraceae (*Mezilaurus*) a Menispermaceae (*Stephania*). Stimuluje dýchání a slinění, snižuje tonus vagu.⁽¹⁸⁾



Obr. 25: Struktura korytuberinu⁽¹⁸⁾

M_w: 327,39

T_f: 240°C⁽¹⁷⁾

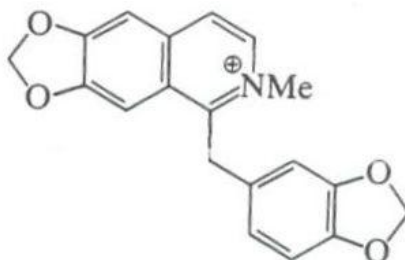
Escholidin

Tetrahydroberberinový kvartérní alkaloid izolovaný z kořenů *Eschscholzia californica*, *E. douglasii* a *E. glauca* a také z nadzemních částí *Hunnemannia fumariaefolia* (Papaveraceae).⁽¹⁸⁾

M_w: 340,398⁽¹⁸⁾

Escholamin

Kvarterní alkaloid z nadzemních částí rostlin rodu *Eschscholzia* sp.⁽¹⁸⁾



Obr.26: Struktura escholaminu⁽¹⁸⁾

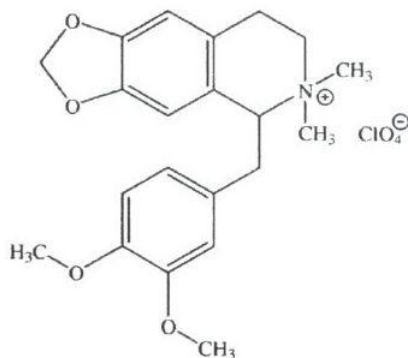
M_w: 322,35⁽¹⁷⁾

Escholinin (N-methylromnein)⁽¹⁸⁾

M_w: 356,441⁽¹⁷⁾

Perchlorát escholininu

Perchlorát escholininu je kvarterní benzyltetrahydroisochinolinový alkaloid izolovaný z *Eschscholzia californica*. Escholinin je N-methyl derivát romneinu. Je to minoritní složka vysoce polární frakce alkaloidů získaných z *Eschscholzia californica*. Dříve byl izolován z *Romneya coulteri* Harv. Odpovídající terciární báze romnein se vyskytuje v několika rostlinných druzích. Perchlorát eschscholininu má tetrahydroisochinolinovou kostru se substituovanou benzolovou skupinou připojenou na C1. Escholinin byl izolován jako perchlorná sůl z kořenů *Eschscholzia californica* Cham. a rekrystalizován z methanolu.⁽²⁵⁾



Obr. 27: Perchlorát escholininu⁽²⁵⁾

3. Biologická aktivita a klinické použití popsané v literatuře

Biologická aktivita a nejvíce proslulé klinické využití sluncovky kalifornské popisované v literatuře jsou hypnotická a anxiolytická aktivita, anticefalalgická aktivita, ale i další účinky.

Hypnotická a anxiolytická aktivita

Sluncovka kalifornská je používána buď samostatně nebo ve sdružení s dalšími léčivými rostlinami (*Passiflora incarnata*, *Valeriana officinalis*, *Melissa officinalis*) k léčbě úzkosti a k indukci spánku u pacientů trpících nespavostí. (Rostlinná droga *Phytonoxon N* je indukována při nervozitou indukované nespavosti, agitaci a úzkosti. Tato droga je složena z alkoholových extraktů rostlin *Corydalis cava* (20%) a *Eschscholzia californica* (80%). Obě rostliny jsou bohaté na isochinolinové alkaloidy odvozené od tyrosinového metabolismu. Nedávný výzkum ukazuje, že mohou ovlivnit metabolismus neurotransmiterů). Mechanismus účinku sluncovky není stále znám. V experimentech má kalifornský mák sedativní účinek na centrální nervový systém a uvolňující efekt na hladké svaly tlustého střeva. Sloučeniny přítomné ve vodno-alkoholovém extraktu sluncovky kalifornské inhibují enzymatickou degradaci a novou syntézu katecholaminů. Dopamin β -hydroxyláza i monoaminoxidáza B jsou inhibovány extraktem sluncovky a toto může vysvětlovat část sedativního a uspávacího efektu.

Jako doplněk: je známo, že enkefaliny, polypeptidové neuromediátory zapojené do regulace dobré nálady a bolesti, jsou inaktivovány peroxidací a dimerizací. Bylo demonstrováno, že kalifornský mák inhibuje tento typ inaktivace a tím prodlužuje enkefalinovou aktivitu. Je možné, že část účinku rostliny *Eschscholzia californica* na centrální nervový systém je způsobena tímto mechanismem účinku. Analogie mezi alkaloidy sluncovky a máku setého (*Papaver somniferum*, *Papaveraceae*) vždy podporovala spekulace o paralelním účinku mezi dvěmi skupinami principu účinku. Vskutku někteří autoři zastávají názor, že izochinolinové alkaloidy účinkují na CNS indukcí spánku a na periferní systém redukcí tonu hladké svaloviny, zvláště hladkého svalu střev. Pro tento důvod je kalifornský mák rostlinou se sedativními, analgetickými a protikřečovými účinky, ale na rozdíl od opiových alkaloidů máku setého se zdá, že alkaloidy sluncovky kalifornské nevyvolávají toleranci a závislost. Všeobecně efekt sluncovky je sedativní a nenarkotický.

Rostlina může být také použita při příhodách charakterizovanými spasmy hladké svaloviny, některými typy astmatu, při bolestivých spasmech gastrointestinálního traktu a zvláště při některých formách dráždivého tračníku, spastické kolitidě a změnách gastrointestinálních a abdominálních funkcí psychosomatického původu.

Anticefalalgická aktivita

Tradičně je sluncovka kalifornská využívána při léčbě některých forem bolesti hlavy. Protože enkefalin jsou zapojeny do zpracování vnímání bolesti vznikající v periferních nociceptivních koncích nervů, látka, která zpomaluje inaktivaci a prodlužuje působení enkefalinů obvykle účinkuje jako analgetikum. Tento mechanismus je odpovědný za účinek sluncovky v případech vasomotorické bolesti hlavy. Také může být zmíněno, že jelikož vasomotorická bolest hlavy má multifaktoriální patogenezi a zcela určitě také úzkostnou složku, terapeutická účinnost sluncovky kalifornské je zvýšena.

Další aktivita

Sanquinarin, jeden z hlavních alkaloidů sluncovky kalifornské má také antibakteriální, cytotoxický a protizánětlivý účinek a je obvykle používán v zubních pastách a ústních vodách proti zubnímu plaku. Sanquinarin má také pozitivní inotropní účinky a inhibuje mnoho enzymů (ATPáza, diaminoxidáza, aminotransferáza).

Snášenlivost

Droga kalifornský mák je léčivo s dobrou snášenlivostí a bez významných vedlejších účinků. Často je předepisován jako fytotherapeutický přípravek i jako farmaceutický lék při poruchách spánku dětí. Nejsou známy kontrolované klinické studie zohledňující těhotenství a kojící ženy, přesto někteří autoři uvádějí, že některé složky rostliny mají relaxující efekt na izolovanou dělohu morčat. Opatrnost nám radí používat tento produkt v těhotenství a kojení jen v opravdu nutných důvodech. ⁽²⁶⁾

Američtí západopobřežní Indiáni jedli listy uvařené nebo opečené na horkých kamenech a občas kouřili listy a okvětní lístky. Latex vytékající z poraněné lodyhy využívali Indiáni k tlumení bolestí zubů. Sluncovka kalifornská je také používána venkovskými populacemi Kalifornie pro své spasmolytické vlastnosti, k redukci toku mléka, jako placky na vyrážky a vředy a navíc rostlina smíchaná s černým pepřem byla používána proti zimnici, žloutence a na kožní problémy. Tinktura nebo suchý extrakt sluncovky kalifornské je používán v Evropě, hlavně Německu a Francii, pro své sedativní a protineuralgické vlastnosti. Farmakologická zkoumání ukázala sedativní a anxiolytické působení extraktu z *Eschscholzia californica* bez toxických jevů, což potvrzuje tradiční využití. Hypnotické, analgetické a sedativní vlastnosti jsou hlavním důvodem, proč se použití této drogy tak široce rozšířilo. ⁽⁴⁾

Byla provedena dvojité zaslepená, randomizovaná, placebem kontrolovaná studie ohodnocující účinnost a bezpečnost fixní kombinace obsahující dva rostlinné extrakty (*Crataegus oxyacantha* a *Eschscholzia californica*) a hořčik při mírných a středních úzkostných stavech s přidruženými funkčními poruchami a v podmínkách obvyklé proskripce lékařem. Bylo zahrnuto celkem

264 pacientů (81% žen, průměrný věk 44,6 let) s přítomnou úzkostí nízké až střední intenzity (celkové Hamiltonovo úzkostné skóre mezi 16-28). Pacienti byli náhodně rozděleni do dvou skupin: 120 dostalo studovaný lék (Sympathyl) a 134 dostalo placebo (dvě tablety dvakrát denně po tři měsíce). Data o účinnosti a bezpečnosti byla získána před prvním podáním a 7, 14, 30, 60 a 90 dní po začátku léčby.

Účinnost byla zjištěna změnou Hamiltonova skóre a změnou subjektivního hodnocení úzkosti pacientem, počtem a procentem citlivých jedinců (pokles o nejméně 50% u Hamiltonova skóre) a celkovým dojmem na lékaře. Hamiltonovo skóre a úzkost klasifikovaná pacientem během léčení indikovaly klinické zlepšení. Úbytek byl větší ve studii s lékem než ve skupině s placebem. Snášenlivost byla určena ze spontánně hlášených nežádoucích účinků u pacientů v průběhu studie. Celkově 15 pacientů ve skupině s lékem a 13 pacientů ve skupině s placebem zjistilo 22 a 15 nežádoucích příhod. Nežádoucí účinky byly hlavně mírné nebo střední trávicí nebo psychopatologické poruchy.⁽²⁷⁾

Droga se oficiálně využívá v několika lékových formách: jako čaj z usušené nati, jako tinktura, kapsle a kapky.

4. Alzheimerova choroba

Etiologie Alzheimerovy choroby není dosud přesně známa. Jsou však známy jednotlivé patogenetické články, v jejichž vzájemném propojení začíná být jasno. Hlavním extracelulárním procesem je ukládání patologické bílkoviny beta-amyloidu. Tato bílkovina vzniká koagulací původně rozpustného beta-peptidu. Beta-peptid je tvořen z bílkoviny tělu vlastní - amyloidového prekursorového proteinu, který se vyskytuje v neuronech. Tento protein je štěpen za normálních okolností enzymem alfa-sekretázou na fragmenty o obsahu aminokyselin do 39, výjimečně do 42. U Alzheimerovy choroby se uplatňují patologické enzymy beta- a g-sekretáza, které následně štěpí amyloidový prekursorový protein na jiných místech než alfa-sekretáza. Tímto štěpením vznikají delší fragmenty, o 42 i více aminokyselinách. Takto vzniklý beta-peptid již přestává být solubilní, v extracelulárním prostoru v mozku koaguluje a polymeruje, a tak vzniká beta-amyloid. Ten se ukládá ve formě plaku - extracelulárních útvarů, kolem kterých se tvoří oblast neurodegenerace, spuštěné beta-amyloidem. Zde dochází k projevům sterilního zánětu, dále k aktivaci zánětlivého enzymu cyklooxygenázy 2, k uvolnění interleukinu 1 a dalších zánětlivých působků, volných kyslíkových radikálů - excitačních aminokyselin. Tyto látky pak působí další škody ve tkáni CNS. Hlavní intraneuronální změnou je degenerace tau-proteinu, spojeného s tvorbou tzv. neurofibrilárních tangles (klubíček, uzlíčků). Neurony postižené degenerací tau-proteinu zanikají. Obecně je společným jmenovatelem všech neurodegenerativních jevů neuronální apoptóza (programovaná buněčná smrt, geneticky zakódovaná - v důsledku odkrytí genového zápisu). V poslední době se však uvažuje také o tom, že je u Alzheimerovy choroby porušena apoptóza, že k ní v určitých případech i patologicky dochází nedostatečně, že je porušena jakási apoptotická rovnováha.

Z neurotransmiterových systémů je nejvíce - především v počátečním stadiu - porušen systém acetylcholinergní, později systém excitačních aminokyselin. Uplatňuje se zřejmě ještě řada dalších mechanismů.

Rizikové faktory Alzheimerovy choroby

Obecně uznávaným rizikovým faktorem vzniku alzheimerovské demence je věk. Procento postižených roste s věkem. Mezi další, již ne všeobecně uznávané rizikové faktory náleží: výskyt Alzheimerovy choroby v blízkém pokrevním příbuzenstvu, přítomnost apolipoproteinu E4, proběhlé úrazy hlavy, zejména spojené s bezvědomím, nízká úroveň vzdělání, ženské pohlaví - tento faktor je velmi sporný. I když bývá v některých studiích zjišťován o něco vyšší výskyt Alzheimerovy nemoci u žen, nutno vzít v potaz, že ženy se dožívají delšího věku než muži.

Klinický obraz Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba se projevuje demencí, která se rozvíjí pomalu, plíživě. Počátek bývá obvykle nenápadný, často okolím zaměňovaný za projevy pouhého stárnutí. Postupně dochází k dalším změnám poznávacích funkcí. Poměrně brzy ve vývoji choroby se obvykle dostavují poruchy orientace v prostoru i čase. Poruchy prostorové orientace se projevují blouděním, nejprve ve vzdálených místech, které však postižený zná, později v bližších místech, a v těžkých stádiích choroby dokonce i ve svém bytě. Pacienti zapomínají staré paměťové obsahy (nebo je postupně zkreslují, vznikají vzpomínkové klamy) a nejsou schopni si zapamatovat nové paměťové obsahy. Poměrně brzy se také dostavují poruchy soudnosti, abstrakce a logického uvažování. S progresí demence se paměť zhoršuje natolik, že nemocní přestávají poznávat tváře a zapomínají jména svých blízkých, nejsou schopni vštípit nové poznatky, někdy u nich dochází k amnestické dezorientaci (jsou dezorientovaní, protože si nezapamatují nic nového, např. kde je jejich lůžko). Velmi často dochází také k poruchám řečových funkcí - k afázii (neschopnost porozumět řeči nebo tvořit řeč v důsledku poškození korových center řeči). Postupně v průběhu demence dochází k poruchám aktivit denního života. Nejprve jsou postiženy složité instrumentální aktivity (manipulace s penězi, práce s počítačem, obsluha různých přístrojů), později dochází k poškození i těch nejzákladnějších denních aktivit, jako je udržení osobní hygieny, oblékání se apod. Dalším okruhem poškození u alzheimerovské demence jsou tzv. behaviorální a psychologické příznaky demence. K nim patří zejména různé druhy neklidu, někdy spojené s agresivitou, emoční poruchy (přidružená deprese, úzkost, afektivní labilita aj.), poruchy spánku a cyklu spánků - bdění, přidružené psychotické příznaky (halucinace a/nebo iluze, bludy aj.). Alzheimerova choroba končí smrtí, přičemž představuje primární, základní příčinu smrti. Trvání Alzheimerovy choroby od vzniku prvních příznaků až do smrti je průměrně 7 - 10 let. U mladších pacientů s familiárním výskytem je někdy průběh maligní, končící i do tří let. Naprosto výjimečně pacienti přežijí i více než 15 let. V terminálních stádiích jsou trvale inkontinentní, zpravidla přestávají chodit.

Terapie Alzheimerovy choroby

Vzhledem k tomu, že etiologie Alzheimerovy choroby není ještě přesně vysvětlena, nejsme schopni tuto poruchu léčit kauzálně. Ovlivňujeme proto známé patogenetické řetězce.

V časných a středních stádiích Alzheimerovy choroby jsou hlavními farmaky inhibitory mozkových acetylcholinesteráz. Centrální acetylcholinergní systém, významný pro mechanismy paměti i pro zachování správného kvalitativního vědomí, je poškozen již v počínajících stádiích demence. Snižuje se množství enzymu syntetizujícího acetylcholin - cholinacetyltransferázy -, presynaptický výdej acetylcholinu, zpětné vychytávání prekursoru cholinu (vysokoafinitní cholinový uptake). Acetylcholin je v synaptické šterbině

rozkládán na cholin a kyselinu octovou, a to pomocí enzymů acetylcholinesteráz i patologicky novotvořených butyrylesteráz. Inhibitory acetylcholinesteráz (a event. i butyrylcholinesteráz) vedou k zablokování odbourávajících enzymů. ⁽³⁵⁾

Nejčastěji užívanými přípravky jsou rivastigmin, donepezil a galantamin. Jejich mechanismem účinku je inhibice cholinesteráz. Po jejich podání se očekává především podstatné zpomalení progresu demence, oddálení vzniku těžkých stadií choroby spojených s nesoběstačností a s umístěním ve zdravotnickém zařízení nebo v ústavu sociální péče. ⁽³⁶⁾

Ve stadiu výzkumu je řada dalších látek, mezi nimi i alkaloid huperzin A. Je to alkaloid čínského lišejníku *Huperzia serrata*. V indikaci Alzheimerovy choroby je zkoušen především v Číně, jeví se jako perspektivní látka. ⁽³⁷⁾

5. Separační a strukturně analytické postupy

5.1. Filtrace

Filtrace je jednou z nejběžnějších operací, v jejímž průběhu dochází k oddělování pevné fáze od ostatních pomocí propustného materiálu, který pevnou fázi zachycuje a dovoluje prostup fázím ostatním. Filtrační zařízení se skládá z nálevky, filtrační bariéry a jímadla na filtrát. Filtrace má být kromě účinnosti dostatečně rychlá, nemá s ní být spojena zbytečná ztráta filtrovaného materiálu, a proto je třeba vždy uvážlivě přistupovat k volbě velikosti zařízení.

5.2. Odpařování

Cílem odpařování je oddělení látek s rozdílnou teplotou varu a skupenstvím. Princip dělicího procesu spočívá v rozdílu mezi složením kapalné fáze a par, které se z ní vytvoří za současného znovuuustalování rovnováhy celého systému. Je to pomocná operace, při níž je prioritní zájem na získání odparku v žádané konzistenci.

5.3. Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně-chemický separační proces používaný k dělení směsi látek na jednotlivé složky. V jeho průběhu se tyto složky (anebo alespoň některá z nich) pohybují nestejnoměrně v systému dvou fází: stacionární (adsorbent) a mobilní (rozpuštědlo, eluent). Má tři základní fáze: nanesení vzorku, dělicí proces a detekci. Látky se v chromatografickém systému pohybují ve formě zón (skvrn).

5.4. Adsorpční chromatografie

Metoda je založena na zadržení rozpuštěné látky povrchovou sorpcí. Separace závisí na rovnováze, která se ustavuje na rozhraní mezi částicemi nepohyblivé fáze a pohyblivé kapalné fáze a na relativní rozpustnosti látky v kapalné fázi. Konkurence mezi molekulami rozpuštěné látky a rozpouštědla o sorpční místa na povrchu adsorbentu vytváří dynamický proces, ve kterém molekuly rozpuštěné látky i rozpouštědla nepřetržitě přicházejí do styku s povrchem, jsou přechodně zadržovány a znovu přecházejí do pohyblivé fáze. Která z obou látek bude silněji vázána na povrchu, záleží na sorpční afinitě těchto dvou molekul. Při desorpci jsou molekuly rozpuštěné látky nuceny pohybovat se vpřed s proudem mobilní fáze. Tato síla působí na všechny látky po dobu, po níž jsou v pohyblivé fázi, stejně. Pouze molekuly s vyšší afinitou k sorbetu budou selektivně zpomalovány.

Rozpouštědla mají různou eluční schopnost, jejich funkce se projevuje v tom, že se uplatňují při ustavování rovnováhy mezi adsorbovanou látkou a aktivními centry adsorbentu a vytěsňují přitom chromatografovanou látku. Na polárních adsorbentech je adsorpce tím větší, čím je rozpouštědlo polárnější, u nepolárních je tomu naopak.

5.5. Gradientová eluce

V průběhu eluce se složení eluentu postupně mění a to tak, že se postupně zvyšuje jeho eluční síla buď kontinuálně nebo skoky. Používá se při analýzách složitých směsí, kdy se jednotlivé složky řádově liší hodnotou svých kapacitních faktorů. Gradientová eluce však dělení vzorku přímo neovlivňuje, navodí jen ostřejší rozdělení pásů látek a tím dochází prakticky k lepší separaci složek ve směsi.

5.6. Kolonová (sloupcová) chromatografie

Při kolonové pracovní metodice se směs látek určená k dělení vnese vhodným způsobem na adsorbent v chromatografické trubici, na kolonu se vlévá eluent, který z kolony vytéká (a obsahuje komponenty dělené směsi), nazývá se eluát a jímá se po frakcích konstantního objemu.

Chromatografie v plošném uspořádání

Adsorbent (stacionární fáze) je při této metodě nanesen ve vrstvě určité tloušťky na neutrální podložce (skleněná deska, hliníková fólie), nebo zároveň položku tvoří.

5.7. Tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography, TLC)

Dělení směsi látek probíhá na základě kapilárního nasávání rozpouštědla stacionární fází, protože deska je svou dolní hranou ponořena do eluční soustavy v chromatografické nádobě. Přitom se uplatňují podle povahy sorbentu a složení mobilní fáze všechny známé principy chromatografického dělení, a to buď každý sám nebo ve vzájemné kombinaci.

5.8. Krystalizace

Pojmem krystalizace se obecně označuje vylučování pevné látky z roztoků nebo tavenin ve formě krystalů, tj. geometrických útvarů určité prostorové struktury a homogenního chemického složení, vyjádřitelného vzorcem. Aby nastala krystalizace z roztoku, musí být porušena fázová rovnováha soustavy, tzn. že roztok musí být přesycen. Bylo-li správně vybráno rozpouštědlo a připraven skutečně nasycený roztok, pak k vyloučení krystalů stačí obvykle pouhé ochlazení.⁽²⁸⁾

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST A VÝSLEDKY

1. Potřeby

1.1. Přístroje

odparka Büchi rotavapor R-114
vodní lázeň Büchi waterbath B-480
fén Babyliss Paris
lednice Zannusi A Energy class
membránová vakuová pumpa Vacuubrand MZ2C
vaříč Fischer Scientific
digitální váhy KERN 440-35A
digitální váhy analytické ADA
pumpa vzduchová ELITE 802
UV lampa Camag 254/366 nm

1.2. Nástroje

Erlenmayerovy baňky
destilační baňka 250 ml
kádinky
nálevky
zkumavky
stojánek na zkumavky
minizkumavky
ochranné brýle
kolona sloupcová chromatografická
stojan
lapák
držák
pinzety
lžičky
komora vyvíjecí
skleněná tyčinka
pilník
kopistka
pipety 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml
pipetík
odměrný válec
laboratorní film Parafilm "M" PECHINEY
nůžky
tužka
pravítko

1.3. Chemikálie

chloroform p.a. (stabilizovaný $\pm 1\%$ ethylalkoholem) PENTA
ethanol 96% PENTA (EtOH)
voda destilovaná
kyselina octová čistá LACHEMA
kyselina vinná p.a. PENTA

1.4. Detekční činidla

Dragendorfovo činidlo koncentrát + voda destilovaná + kyselina vinná

1.5. Materiál

alobal
silikagel
vata
nit
TLC hliníková folie Silikagel 60 F254, tloušťka vrstvy 0,2 mm, 20x20 cm,
MERCK

1.6. Zkratky

KBA: kvartérní benzofenanthridinové alkaloidy
NMR: nukleární magnetická resonance
TLC: tenkovrstvá chromatografie

2. Postup práce

2.1 Původ drogy

Droga ve formě sušené natě s kořeny byla získána sběrem z introdukované kultury (komerční osivo) firmou Planta Naturalis Markvartice u Sobotky.⁽³⁸⁾

2.2. Příprava primárního extraktu a jeho čištění

36,54 kg drogy bylo umístěno do perkolátoru, zalito EtOH ~96% a po dvou dnech stání perkolováno celkem 328 litry (1:9,2). Získaný extrakt byl zahuštěn na cca 4 litry a následně digerován při 50 °C 3x několika litry 1% H₂SO₄; vodná vrstva byla vždy slita. Byl získán hnědý roztok o pH ~ 2.

Tento spojený hnědý digerát byl zfiltrován nejprve přes viskózní filtr, posléze přes vrstvu křemeliny. Jeho celkový objem byl 17,2 litrů.⁽³⁸⁾

2.3. Příprava alkaloidního výtřepku A z primárního extraktu

Kyselý vodný extrakt byl zpracován po 1000 ml: do třepací nálevky bylo k tomuto roztoku nalito 400 ml etheru a po částech a za stálého třepání byla provedena alkalizace 10% Na₂CO₃ až na pH 9-10. Vytřepání 400 ml etheru bylo provedeno 5x.

Získaný etherový výtřepok byl odpařen téměř do sucha, odparek byl za mírného zahřátí (50 °C) rozpuštěn v 1000 ml 1% H₂SO₄ (odstranění pryskyřičnatých podílů). Následně bylo přidáno 400 ml etheru a po částech a za neustálého třepání potřebné množství 10% Na₂CO₃, až na pH 9-10. Vytřepání etherem (vždy 400 ml) bylo provedeno 8x.

Po odpaření byl získán nahnědlý výrazně krystalický odparek. Spojené sodové fáze byly použity pro izolaci dalších alkaloidů.⁽³⁸⁾

2.4. Odstranění bazí pseudokyanidů z výtřepku A

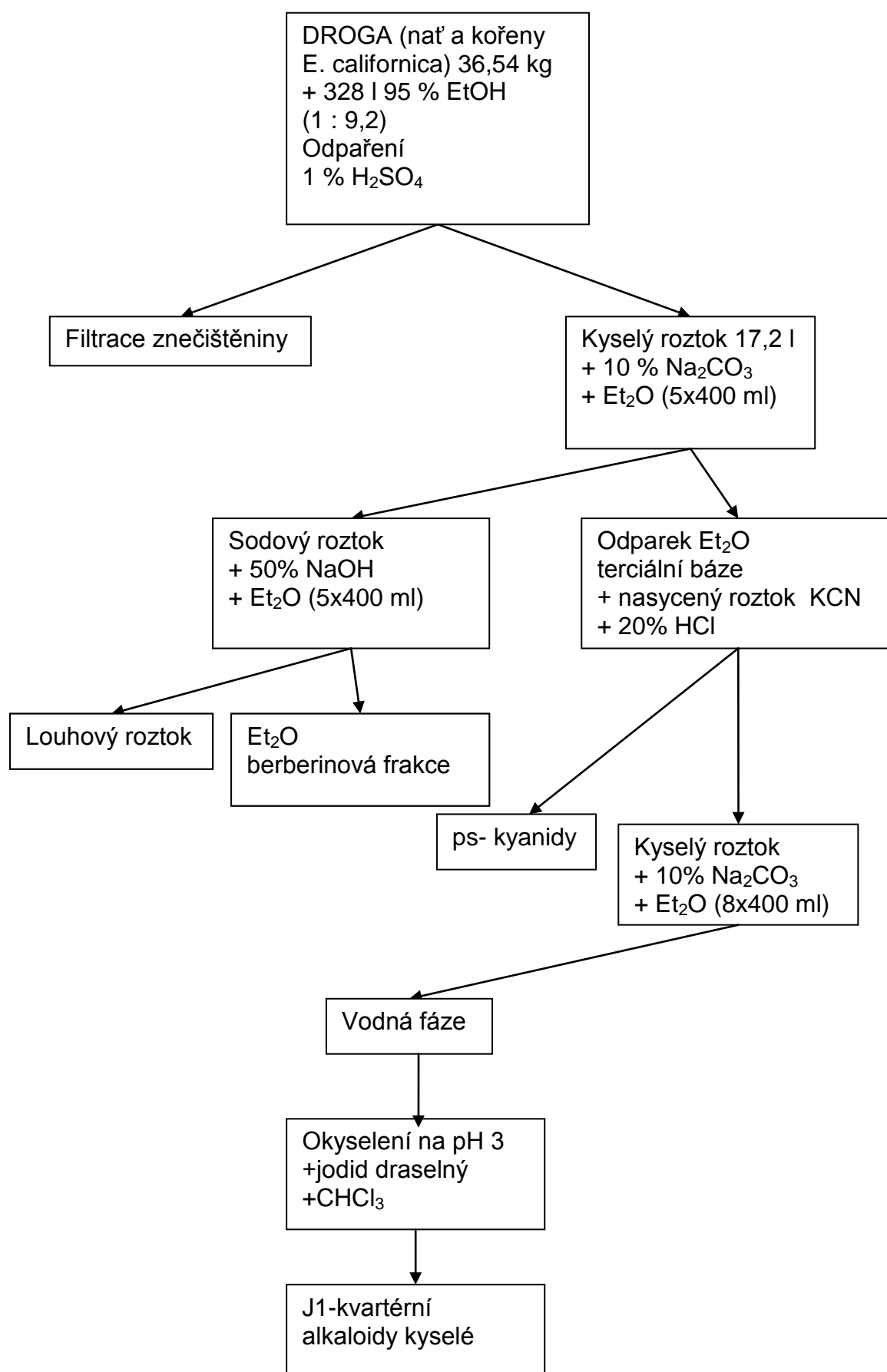
Předčištěný alkaloidní výtřepok A byl rozpuštěn v 600 ml 1,5% H₂SO₄ za tepla (50 °C), roztok byl zředěn vodou na 800 ml (pH ~ 3) a po malých částech byl přidáván koncentrovaný roztok kyanidu draselného (18 g KCN/40 ml vody) až do alkalické reakce (pH ~ 9). Po chvíli stání byla bělavá suspenze okyselena 20% HCl na pH ~ 2 a následně ponechána v klidu asi 1 hodinu. Získaný roztok byl zfiltrován, sediment oddělen, promyt vodou, vysušen, zfiltrován a odpařen. Alkaloidní baze byly připraveny obvyklým způsobem (metodou podle Gadamera). Odparek těchto bazí byl tmavě hnědý, velmi viskózní.

Ke zbylému kyselému roztoku (1000 ml) bylo přidáno 400 ml Et₂O, po částech 10% Na₂CO₃ (pH 9-10) a provedeno vytřepání (8x400 ml Et₂O). Éterové vrstvy byly spojeny a odpařeny.⁽³⁸⁾

2.5. Příprava kvartérních alkaloidů kyselých

Vodná fáze byla okyselena na pH 3, byl přidán jodid draselný a kvartérní alkaloidy byly vytřepány do chloroformu. Objem výsledného výtřepku byl zmenšen na odparce.⁽³⁸⁾

Schéma 1. Extrakce alkaloidů z drogy *Eschscholzia californica*⁽³⁸⁾



2.6. Hledání správné vyvíjecí soustavy a detekčního činidla

Shromáždily jsme možné vyvíjecí soustavy.⁽³⁹⁾

I. Chloroform-benzen sycený formamidem a smíšený s methanolem (40+50+10)

II. Chloroform-ethylacetát-methanol (40+40+20)

III. Cyklohexan-diethylamin (90+10)

IV. Cyklohexan-chloroform-diethylamin (70+20+10)

V. Xylen-butanon-methanol-diethylamin (45,45+45,45+6,82+2,28)

Poté jsme vyhledaly detekční činidla, která se využívají k důkazům alkaloidů.

Sulfid ceričitý-kyselina sírová: 0,1 g sulfidu siřičitého se rozpustí ve 4 ml vody, přidá se 1 g kyseliny trichloroctové, roztok se uvaří a přikapává se koncentrovaná kyselina sírová, dokud nezmizí zákal.

Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera:

- roztok A: se připraví rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.
- roztok B: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody
- zásobní roztok: se připraví smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ta může být uložena několik měsíců v lednici.
- činidlo pro analýzu: se připraví tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidá 5 ml zásobního roztoku.

Jodoplatinát draselný: 0,3 ml 5% hexachloroplatiničité kyseliny se smísí s 4,8 ml vody a 5 ml 6% roztoku jodidu draselného.⁽³⁹⁾

Po zjištění těchto informací jsme postupně vyzkoušely jednotlivé soustavy a sledovaly, u které dojde k oddělení jednotlivých kvarterních alkaloidů. Současně jsme také zkoušely jednotlivá detekční činidla.

Byl připraven si 5% roztok výtřepku J1 v chloroformu, ten byl nanesen na vyvíjecí desku a ta byla umístěna do zkoušené vyvíjecí soustavy. Po době dostačující k dosažení čela byla deska vyjmuta, usušena a postříkána detekčním činidlem.

Po první detekci jsme zjistily, že 5% roztok výtřepku J1 je značně koncentrovaný, a proto jsme dle pokračovaly s roztokem 1%.

Po odzkoušení všech 5 vyvíjecích soustav jsme nenašly ani jednu vhodnou. U většiny zůstaly nanesené vzorky na startu. U vyvíjecí soustavy II. sice došlo k rozdělení, ale to nebylo dostatečné. Proto jsme hledaly další vyvíjecí soustavy:

VI. Ethanol-kyselina octová p.a.-voda (60+30+10)

VII. Methanol-butanol-benzen-voda (60+15+10+15)

VIII. Aceton-acetonitril-kyselina octová p.a. (50+30+20)

IX: Butanol-kyselina octová p.a.-voda (62,5+12,5+25)

Tyto soustavy jsou více polární, proto docházelo k většímu oddělení. Vyhovovala vyvíjecí soustava *VI.ethanol-kyselina octová p.a.-voda (60+30+10)*. Ze zjištěných detekčních činidel bylo nejvýhodnější činidlo Dragendorffovo.

2.7. Zkušební sloupcová chromatografie

Nejprve bylo množství 1 g extraktu rozpuštěno v chloroformu. Na vodní lázni se ohřál suchý silikagel a postupně se přidával roztok extraktu v chloroformu. Směs se zahřívala tak dlouho, dokud nedošlo k úplnému odpaření chloroformu. Tím bylo docíleno neadsorbování extraktu na silikagel. Sloupcová kolona o objemu 100 ml se naplnila 20 g silikagelu rozptýleného v dvojnásobku eluční soustavy-2,5% roztoku ethanolu v chloroformu. Na závěr byl dosypán suchý silikagel s naadsorbovaným extraktem. Aby bylo docíleno rovnoměrného usazení směsi, po celou dobu přípravy se nechával odkapávat eluát. Byla ale udržována hladina roztoku na sloupci, aby nedošlo k vyschnutí silikagelu, které by způsobilo nerovnoměrné vymývání látek. Na povrch silikagelu byl umístěn filtrační papír a zatížen skleněnými kuličkami. Jeho funkcí bylo zamezit víření silikagelu při dolévání eluentu.

Po vyhotovení sloupcové kolony jsme začaly odchytávat jednotlivé frakce o velikosti 10 ml. Vždy po odkapání šesti frakcí byla zvýšena koncentrace dolévaného roztoku. Tímto způsobem jsme získaly 32 frakcí.

Tabulka 1: Zkušební sloupcová chromatografie

Frakce č.	Eluční soustava	Výskyt alkaloidů
1	Chloroform-ethanol 97,5:2,5	Ne
2	Chloroform-ethanol 97,5:2,5	Ne
3	Chloroform-ethanol 97,5:2,5	Ne
4	Chloroform-ethanol 97,5:2,5	Ne
5	Chloroform-ethanol 97,5:2,5	Ne
6	Chloroform-ethanol 97,5:2,5	Ne
7	Chloroform-ethanol 95:5	Ano
8	Chloroform-ethanol 95:5	Ano
9	Chloroform-ethanol 95:5	Ano
10	Chloroform-ethanol 95:5	Ano
11	Chloroform-ethanol 95:5	Ano
12	Chloroform-ethanol 95:5	Ano-nejvíce
13	Chloroform-ethanol 90:10	Ano
14	Chloroform-ethanol 90:10	Ano
15	Chloroform-ethanol 90:10	Ano
16	Chloroform-ethanol 90:10	Ano
17	Chloroform-ethanol 90:10	Ano
18	Chloroform-ethanol 90:10	Ano
19	Chloroform-ethanol 85:15	Málo
20	Chloroform-ethanol 85:15	Málo
21	Chloroform-ethanol 85:15	Málo
22	Chloroform-ethanol 85:15	Málo

Frakce č.	Eluční soustava	Výskyt alkaloidů
23	Chloroform-ethanol 85:15	Málo
24	Chloroform-ethanol 85:15	Málo
25	Chloroform-ethanol 80:20	Málo
26	Chloroform-ethanol 80:20	Málo
27	Chloroform-ethanol 80:20	Málo
28	Chloroform-ethanol 80:20	Málo
29	Chloroform-ethanol 80:20	Málo
30	Chloroform-ethanol 80:20	Málo
31	Chloroform-ethanol 75:25	Ne
32	Chloroform-ethanol 75:25	Ne

Jednotlivé frakce byly odpařeny do zbytku přibližně 1 ml. Zbytek byl přenesen pomocí Pasteurovy pipety do minizkumavky. Získaná vyšší koncentrace byla nanášena na TLC.

TLC se vyvíjelo v soustavě *II. Ethanol-kyselina octová p.a. voda (60+30+10)*. Po vyvinutí byl detekován výskyt alkaloidů postříkem Dragendorffova činidla.

2.8. Sloupcová chromatografie výtřepku J1 drogy *Eschscholzia californica*

Postupovaly jsme obdobně jako při zkušební chromatografii.

2.8.1. Příprava silikagelu pro sloupcovou chromatografii

Silikagel prošel aktivací, tedy byl udržován čtyři hodiny při 160°C v sušárně. Poté proběhla fáze deaktivace za přítomnosti vody.

2.8.2. Příprava roztěru

Nejprve bylo množství 60 g extraktu rozpuštěno v chloroformu. K přípravě roztěru bylo použito 100 g silikagelu, který byl na vodní lázni smíchán s chloroformovým roztokem extraktu. Po odpaření chloroformu došlo k naadsorbování látky na silikagel.

2.8.3. Příprava sloupcové kolony

Sloupcová kolona byla naplněna 500 g silikagelu rozptýleného v 1350 ml chloroformu. Na závěr byl dosypán silikagel s naadsorbovaným extraktem. Aby bylo docíleno rovnoměrného usazení směsi, po celou dobu přípravy se nechával odkapávat eluát. Byla ale udržována hladina roztoku na sloupci, aby nedošlo k vyschnutí silikagelu, které by způsobilo nerovnoměrné vymývání látek. Na povrch silikagelu byl umístěn filtrační papír a zatížen skleněnými kuličkami. Jeho funkcí bylo zamezit víření silikagelu při dolévání eluentu.

2.8.4. Průběh sloupcové chromatografie

Po začátku odkapávání jsme sledovaly pohyb barevné zóny. Když tato zóna dosáhla 2/3 kolony, začaly jsme odchyťovat frakce o velikosti 250 ml.

2.8.5. Příprava vzorku k TLC a detekci

Z každé frakce byl odebrán vzorek do minizkumavky. Obsah byl odpařen do sucha a poté zředěn daným rozpouštědlem do objemu max. 1 ml. Z takto upraveného vzorku byla část nanášena kapilárou na TLC desku. TLC deska byla vyvíjena ve vyvíjecí soustavě II. Po dosažení čela byla deska vysušena fénem dosucha. Po vyfotografování skvrn viditelných pod UV 254 a 366 nm došlo k postříkání detekčním činidlem připraveným v čase potřeby.

2.8.6. Uchování jednotlivých frakcí

Jednotlivé frakce byly zakonzentrovány na odparce do objemu 10 ml.

Tabulka 2: Sloupcová chromatografie

Frakce číslo	Eluent	Alkaloidy	Popis frakce
1	Chloroform	Ano	Žlutohnědá
2	Chloroform	Ano	Světle žlutá
3	Chloroform	Ne	Světlá
4	Chloroform	Ano	Žlutá
5	Chloroform	Ano	Zelená
6	Chloroform	Ano	Světle žlutá
7	Chloroform	Ne	Světle žlutá
8	Chloroform	Ne	Světle žlutá
9	Chloroform	Ne	Čirá žlutavá
10	Chloroform	Ne	Čirá mírně žlutavá
11	Chloroform	Ne	Světle žlutá
12	Chloroform	Ne	Světle žlutá
13	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Světle žlutá
14	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Světle žlutá
15	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Tmavě žlutá
16	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Světle žlutá
17	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Čirá lehce žlutá
18	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Čirá světle žlutá
19	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Čirá světle žlutá
20	CHCl ₃ -EtOH 0,5%	Ne	Čirá lehce naoranžovělá
21	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ne	Čirá světle žlutá
22	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ne	Čirá světle žlutá
23	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá světle žlutá
24	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá světle žlutá
25	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá světleoranžová
26	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá světle naoranžovělá
27	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá světle žlutá
28	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá žlutá

Frakce číslo	Eluent	Alkaloidy	Popis frakce
29	CHCl ₃ -EtOH 1%	Ano	Čirá žlutá
30	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá slaběnaoranžovělá
31	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně oranžová
32	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně oranžová, tmavá zóna
33	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně oranžová
34	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá světlejší oranžová
35	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně žlutá
36	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně žlutá
37	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně žlutá
38	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně žlutá
39	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně žlutá
40	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá středně žlutá
41	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá světle žlutá
42	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá světle žlutá
43	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá žlutá
44	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá žlutá
45	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Čirá žlutá, krystal
46	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Žlutá
47	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Žlutá
48	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světlejší žlutá
49	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
50	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
51	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
52	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
53	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
54	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
55	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
56	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
57	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
58	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
59	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
60	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
61	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
62	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
63	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
64	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
65	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
66	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
67	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá

Frakce číslo	Eluent	Alkaloidy	Popis frakce
68	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
69	CHCl ₃ -EtOH 2%	Ano	Světle žlutá
70	CHCl ₃ -EtOH 3%	Ano	Světle žlutá
71	CHCl ₃ -EtOH 3%	Ano	Světle žlutá
72	CHCl ₃ -EtOH 3%	Ano	Světle žlutá
73	CHCl ₃ -EtOH 3%	Ano	Světle žlutá
74	CHCl ₃ -EtOH 3%	Ano	Světle žlutá
75	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
76	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
77	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
78	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
79	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
80	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
81	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
82	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle oranžová
83	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
84	CHCl ₃ -EtOH 5%	Ano	Světle žlutá
85	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle žlutá
86	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle žlutá
87	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle žlutá
88	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle žlutá
89	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle žlutá
90	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle růžová
91	CHCl ₃ -EtOH 7%	Ano	Světle žlutá
92	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
93	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
94	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
95	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
96	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
97	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle růžová
98	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
99	CHCl ₃ -EtOH 10%	Ano	Světle žlutá
100	CHCl ₃ -EtOH 15%	Ano	Světle žlutá
101	CHCl ₃ -EtOH 15%	Ano	Světle žlutá
102	CHCl ₃ -EtOH 15%	Ano	Světle žlutá
103	CHCl ₃ -EtOH 15%	Ano	Světle žlutá
104	CHCl ₃ -EtOH 20%	Ano	Světle žlutá
105	CHCl ₃ -EtOH 20%	Ano	Světle žlutá
106	CHCl ₃ -EtOH 20%	Ano	Žlutá
107	CHCl ₃ -EtOH 25%	Ano	Žlutá

Frakce číslo	Eluent	Alkaloidy	Popis frakce
108	CHCl ₃ -EtOH 25%	Ano	Žlutá
109	CHCl ₃ -EtOH 30%	Ano	Žlutá
110	CHCl ₃ -EtOH 30%	Ano	Žlutá
111	CHCl ₃ -EtOH 30%	Ano	Žlutá
112	CHCl ₃ -EtOH 30%	Ne	Žlutá
113	CHCl ₃ -EtOH 35%	Ne	Žlutá
114	CHCl ₃ -EtOH 35%	Ne	Žlutá
115	CHCl ₃ -EtOH 35%	Ne	Žlutá
116	CHCl ₃ -EtOH 40%	Ne	Žlutá
117	CHCl ₃ -EtOH 40%	Ne	Žlutá
118	CHCl ₃ -EtOH 40%	Ne	Žlutá
119	CHCl ₃ -EtOH 45%	Ne	Žlutá
120	CHCl ₃ -EtOH 45%	Ne	Žlutá
121	CHCl ₃ -EtOH 45%	Ne	Žlutá
122	CHCl ₃ -EtOH 50%	Ne	Žlutá
123	CHCl ₃ -EtOH 50%	Ne	Žlutá
124	CHCl ₃ -EtOH 50%	Ne	Žlutá
125	CHCl ₃ -EtOH 55%	Ne	Žlutá

2.9. Spojování frakcí

Po dokončení dělení směsi bylo na základě jednotlivých TLC chromatogramů rozhodnuto o spojení frakcí se stejnými látkami.

Tabulka 3: Spojování frakcí

Frakce číslo	Spojená frakce	Frakce číslo	Spojená frakce
1-22	1	59-72	8
23	2	73-91	9
24	3	92	10
25	4	93-95	11
26-31	5	96	12
32-42	6	97-103	13
43-58	7	104-106	14

2.10. Výběr frakce

Po spojení frakcí byly jednotlivé směsi nanášeny na společný velký chromatogram a ten byl vyvinut ve vyvíjecí komoře za stejných podmínek. Po vyvinutí a detekci bylo rozhodnuto, že se bude pokračovat se spojenou frakcí 5 (největší koncentrace alkaloidů, výskyt nejméně dvou alkaloidů).

2.11. Čištění spojené frakce 5

2.11.1. Zkušební provedení TLC

Několik kapek spojené frakce 5 bylo naředěno chloroformem na 2 ml a poté nanášeno na TLC desku, ta byla ponořena do vyvíjecí soustavy *VI. ethanol-kyselina octová p.a.-voda (60+30+10)*. Po vyvinutí byla provedena detekce Dragendorffovým činidlem. (obr. Je)

Poté bylo provedeno zkušební vyvíjení na velké chromatografické desce. K dokonalému rozdělení nedošlo, což bylo způsobeno vysokou koncentrací vzorku. Po naředění byl vyvinut další TLC chromatogram a po detekci bylo zjištěno dobré rozdělení spojené frakce 5. Byly vybrány dva pruhy, které ukazovaly na přítomnost individuálních alkaloidů.

2.11.2. Čištění

Spojená frakce 5 byla naředěna chloroformem a poté postupně nanášena na velké TLC desky. Ty byly vyvíjeny ve velkých chromatografických komorách. Po kontrole pod UV paprsky a detekci Dragendorffovým činidlem byly jednotlivé pruhy vystříhnuty z TLC desky. Vystříhnuté části byly nastříhány na malé kousky. Poté byla provedena extrakce přítomných látek do chloroformu a pevné části odstraněny filtrací. Tak byly získány dvě zředěné soustavy s obsahem jediného alkaloidu. Po zkoncentrování obou roztoků byla provedena TLC, která potvrdila vyčištění směsi. Oba koncentrované roztoky byly převedeny do zvážených destilačních baněk, ty byly uzavřeny a obaleny alobalem a uchovány v digestoři. Po dvou dnech nedošlo k oddělení krystalické fáze, a proto byly baňky uloženy v lednici. Ani v lednici nedošlo ke změně skupenství. Proto bylo úplně odpařeno rozpouštědlo a zbytek byl zvážen.

Směs A: $75,533 - 75,514 = 0,019$ g

Směs B: $75,617 - 75,575 = 0,042$ g

Po vysušení byly zbytky rozpuštěny v 1 ml methanolu. Došlo k zakalení roztoku. Proto byly soustavy zabaleny do alobalu a uloženy v lednici. Po ochlazení se zakalení nezměnilo. Proto byl methanol se sraženinou odsán a přemístěn do zkumavek I, zbytky v destilačních baňkách byly rozpuštěny v chloroformu a přemístěny do zkumavek II. Chloroform byl odpařen, ale žádné krystaly se neobjevily ani po tomto zahuštění.

S těmito odparky bylo provedeno zkušební TLC, na kterém se objevily dva alkaloidy a velmi málo nečistot. Zkumavky II byly tedy poslány na NMR.

V. DISKUSE A ZÁVĚR

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie se rozhodla pracovat na výzkumu látek přírodního původu, které by mohly pomoci usnadnit léčbu Alzheimerovy choroby. Jako potenciálně využitelné látky k léčbě Alzheimerovy choroby se ukázaly inhibitory acetylcholinesterázy. Do této skupiny, mimo jiných látek izolovaných z rostlin, patří alkaloidy. Jedním z taxonů, který tento typ látek obsahuje, je taxon *Eschscholzia californica* z čeledi Papaveraceae.

Tato diplomová práce navazuje na poznatky získané z práce: Doležal, J.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2008, 65 s.

Cílem práce bylo získat z dodaného extraktu J1 alespoň jeden čistý kvartérní alkaloid, identifikovat jej a určit u něj možnost využití k léčbě Alzheimerovy choroby.

Prvním krokem byla úprava koncentrace extraktu. Extrakt byl naředěn chloroformem na koncentraci 5%, ale po vyvinutí soustavy byla tato koncentrace dále snížena, a to na 1%. Tato koncentrace zcela vyhovovala.

Dalším úkolem bylo nalezení vhodné vyvíjecí soustavy pro metodu TLC, která byla využita k detekci přítomných alkaloidů. Bylo vybráno několik směsí rozpouštědel. Pro vyvinutí se ukázala nejvhodnější směs ethanol-kyselina octová p.a.-voda (60:30:10), u které došlo k nejvíce signifikantnímu rozdělení extraktu. Jako detekční činidlo bylo vybráno Dragendorffovo činidlo, které jednoznačně detekovalo alkaloidy. Toto činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5g kyseliny vinné v 5 ml předem připraveném koncentrátu, tento roztok byl nakonec naředěn 50 ml destilované vody. Po postřiku na TLC desku se nechalo detekční činidlo zaschnout, poté se provádělo vyhodnocení výsledku.

Následujícím krokem bylo připravení zkušební sloupcové chromatografie. Byl zvolen typ gradientové eluce s použitím směsi ethanolu chloroformu jako eluční kapaliny, o koncentraci 2,5% - 25% ethanolu. Dělení probíhalo na deaktivovaném silikagelu. Nanášecí poměr byl 1:20. Odchyťovaly jsme frakce o objemu 10 ml, po získání 32 frakcí byla chromatografie ukončena.

Získané frakce byly odpařeny téměř do sucha a tyto odparky byly nanášeny na TLC desky. Po vyvinutí byly alkaloidy detekovány pomocí UV záření o vlnové délce 254 a 366 nm a poté i postřikem Dragendorffovým činidlem. Největší koncentrace alkaloidů byla zjištěna u frakce č. 12 (5% eluční směs).

Po ověření dělitelnosti extraktu touto metodou jsme přikročily k dělení většího množství extraktu. Bylo použito 60 g extraktu, který byl nanesen na 100 g silikagelu. Tento roztěr byl nanesen na kolonu obsahující 500 g silikagelu a 1350 ml čistého chloroformu. Nanášecí poměr byl tedy 1:10. Frakce o velikosti 250 ml byly odpařeny na objem 10 ml. Vzorek z každé frakce byl naředěn a nanesen na TLC desku, vyvinutí bylo provedeno v soustavě ethanol-kyselina

octová p.a.-voda (60:30:10) a detekce byla prováděna pomocí UV záření (obr. I.-IV. v příloze) a postřikem Dragendorffovým činidlem (obr. V.-IX. v příloze). U jednotlivých frakcí byla zaznamenána barva frakce, procentuální zastoupení eluční směsi a výskyt alkaloidů. Vzniklo tak 125 frakcí, které byly po vyhodnocení obsahu spojeny do 14 spojených frakcí.

Pro kontrolu byl vytvořen hromadný chromatogram. Extrakt J1 zředěný chloroformem byl nanesen na TLC desku a po vyvinutí byly zjištěny nejméně tři různé alkaloidy.

Po vyhodnocení spojených frakcí byla vybrána spojená frakce 5, která obsahovala dva alkaloidy o vysoké koncentraci. Cílem bylo oddělení těchto dvou alkaloidů a odstranění nečistot. Byla zvolena metoda extrakce látky rozpouštědlem. Naředěná spojená frakce 5 byla nanášena na velké TLC desky. Po vyvinutí (45 minut) se detekovaly dva přítomné alkaloidy pomocí UV záření jako dva oddělené pruhy. Tyto dva pruhy byly zaznamenány tužkou, TLC deska byla postříkána činidlem a pruhy byly vystříhnuty. Každý pruh byl nastříhán na malé kousky, ty byly ponořeny do chloroformu, po 10 minutách míchání byl roztok přefiltrován a filtrát byl sbírán do Erlenmayerovy baňky. Filtrát byl zahuštěn a byla u něj provedena detekce pomocí TLC. U každého roztoku byl prokázán jeden alkaloid a velmi málo nečistot.

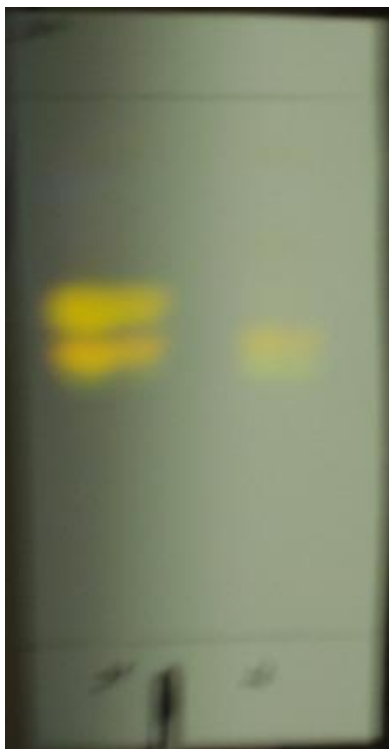
Proto jsme tyto roztoky odložily do lednice. Ani změnou teploty nedošlo ke změně fáze soustavy, neobjevily jsme žádné krystaly. Odpařily jsme tedy rozpouštědlo dosucha a výslednou sušinu jsme zvážily. Bylo získáno 19 mg alkaloidu A a 42 mg alkaloidu B. Po zjištění hmotnosti jsme rozpustily látku v methanolu, ihned došlo k vyloučení krystalů. Ty byly velmi jemné, proto jsme tyto směsi uložily do lednice. Nedošlo ale ke změně velikosti, ani množství krystalů. Tyto nečistoty vyloučené v methanolu byly tedy odsány a uloženy v lednici, zbytky byly rozpuštěny v chloroformu, chloroform byl odpařen dosucha. Po odpaření se na stěnách baněk vyloučily krystaly ve formě bílých vláken. Poté byly vzorky nanесeny na TLC, po detekci byl potvrzen výskyt dvou různých alkaloidů, ale také byly zaznamenány i minimální nečistoty.

Obě získané látky byly po zjištění retenčního faktoru zaslány ke zjištění struktury pomocí metody NMR.

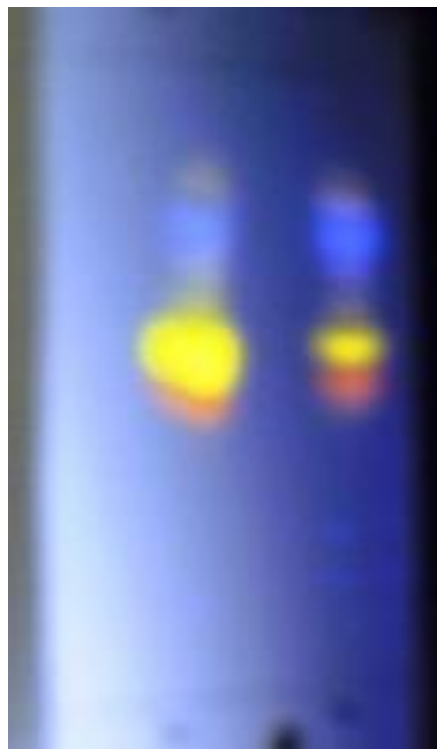
Poté mělo následovat zjištění biologického účinku – inhibice acetylcholinesterázy. Metoda je založena na zjišťování aktivity sledované látky standardním testem s elektrometrickou instrumentací. Ke směsi acetylcholinu a acetylcholinesterázy inhibované sarinem (organofosfátová bojová chemická látka schopná inaktivovat enzym acetylcholinesterázu fosforylací a fosfonylací aktivní části tohoto enzymu) se v prostředí o pH 8 při teplotě 25 °C přidá reaktivátor, který vyváže z aktivního místa enzymu inhibitor (sarin) a zároveň se přidá i zkoumaná látka. Sledujeme aktivitu acetylcholinesterázy měřením potenciostatickou titrací kyseliny octové uvolněné činností acetylcholinesterázy, která rozkládá acetylcholin na kyselinu octovou a cholin. Bohužel k této zkoušce nedošlo, jelikož celý objem látky byl odeslán ke zjištění struktury pomocí metody NMR.

Závěrem lze konstatovat, že se nám bohužel podařilo izolovat jen 2 alkaloidy, a to ještě ve velmi malém množství. Důvodem bylo pravděpodobně nedokonalé rozdělení směsi na koloně, podobné složení alkaloidů bylo detekováno i v dalších frakcích. Řešením může být důkladnější vymytí jednotlivých složek eluentem konstantního složení. Problémem bylo také čištění směsi, ve které bylo požadovaného alkaloidu malé množství. Z tohoto důvodu a kvůli doposud neuskutečněné identifikaci získaného alkaloidu nebylo možno stanovit jeho aktivitu vůči erytrocytární acetylcholinesteráze.

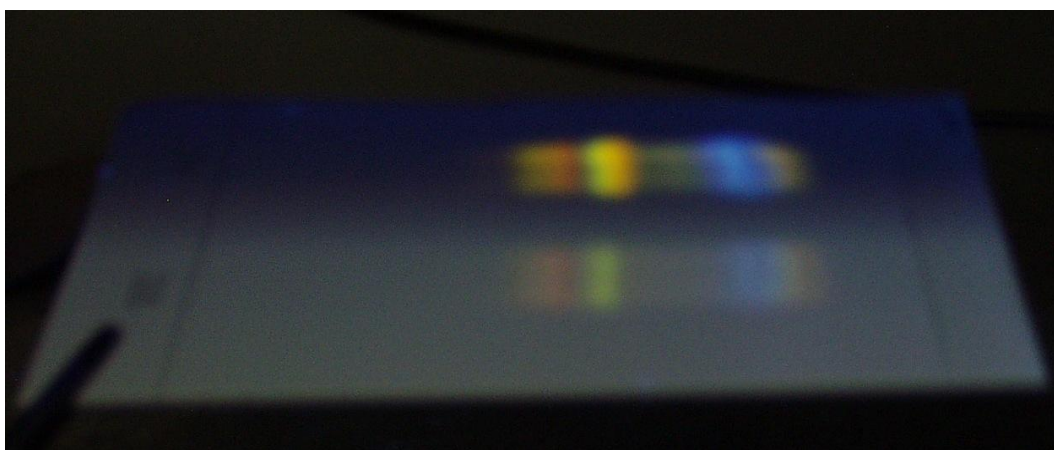
VI. PŘÍLOHY



Obr. I. UV detekce



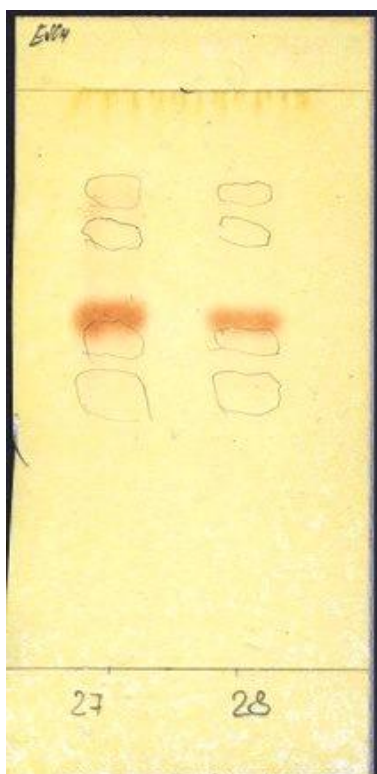
Obr. II. UV detekce



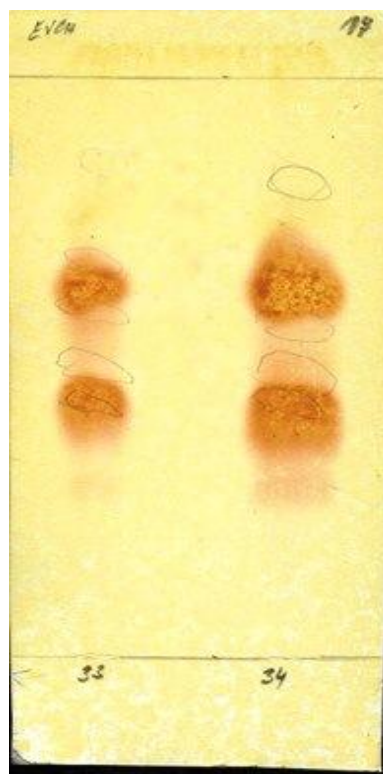
Obr. III. UV detekce



Obr. IV. UV detekce



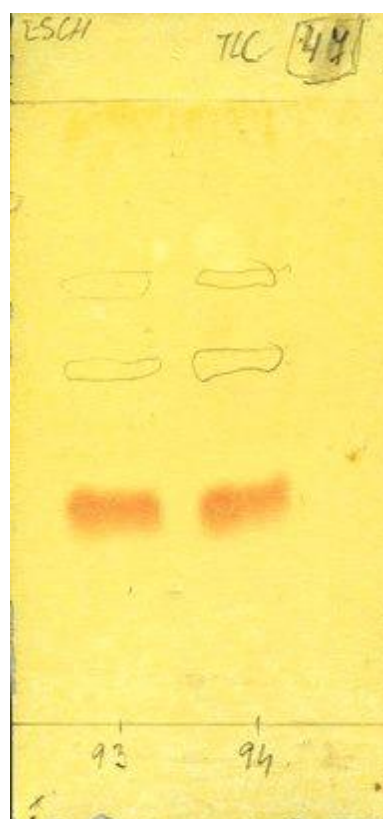
Obr. V. Chromatogram frakcí 27 a 28
po postřiku detekčním činidlem



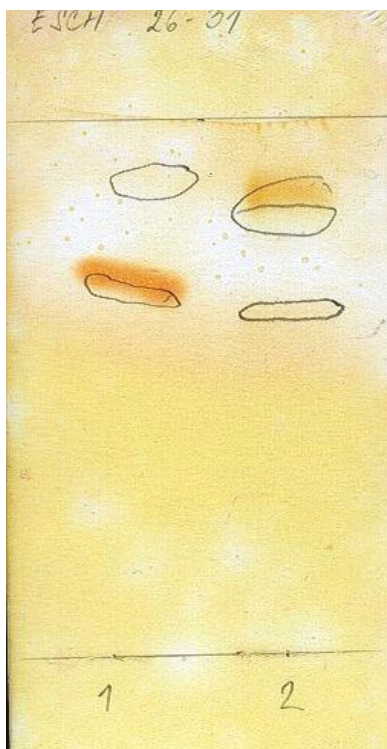
Obr. VI. Chromatogram frakcí 33 a 34
po postřiku detekčním činidlem



Obr.VII. Chromatogram frakcí 47 a 48
po postřiku detekčním činidlem



Obr.VIII. Chromatogram frakcí 93 a 94
po postřiku detekčním činidlem



Obr IX. Chromatogram spojené frakce 5
po extrakci rozpouštědlem

VII. ABSTRAKT

ABSTRAKT

Linzerová, M.: Biologický účinek rostlinných metabolitů II. Izolace alkaloidů z *Eschscholzia californica* Cham. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2009, 66 stran

Bylo provedeno dělení extraktu J1 získaného z rostliny *Eschscholzia californica* Cham. Dělení bylo prováděno na chromatografickém sloupci naplněném silikagelem, jako eluční soustava byla vybrána směs chloroform-ethanol 100+0 až 45+55. K zjištění přítomnosti alkaloidů byla zvolena metoda tenkovrstvé chromatografie. Jako eluční soustava byla zvolena polární směs ethanol-kyselina octová p.a.-voda (60+30+10). Detekce byla prováděna pomocí UV záření a postřiku Dragendorffovým činidlem. Frakce obsahující nejvyšší koncentraci alkaloidů byly spojeny a bylo u nich provedeno čištění. Byly získány dva různé alkaloidy. Tyto alkaloidy byly předány ke zjištění struktury pomocí metody NMR.

Klíčová slova: sluncovka kalifornská, *Eschscholzia californica*, alkaloidy, sloupcová chromatografie, Alzheimerova choroba, benzofenantridinové alkaloidy

ABSTRACT

Linzerová, M.: A Biological Effect of Plant Metabolites II. The Isolation of Alkaloids from *Eschscholzia californica* Cham. A diploma work, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2009, 66 pages

Extract J1 from plant *Eschscholzia californica* Cham. was separated. The separation was performed on a chromatografic column filled by silica gel, mixture of chloroform-ethanol 100+0 to 45+55 was chosen as eluent. For detection was taken thin-layer chromatography. A polar mixture of ethanol-acetic acid-water (60+30+10) was chosen as eluent mixture. Detection was evaluated by UV radiation and spray of Dragendorff reagent. The fractions containing the highest concentration of alkaloids were coupled and purified. Two different alkaloids were obtained. The structures of these alkaloids were found out by NMR method.

Keywords: Californian Poppy, *Eschscholzia californica*, alkaloids, column chromatography, Alzheimer disease, benzophenanthridin alkaloids

VIII. LITERATURA

- (1) <http://www.celysvet.cz/fotky-sluncovka-kalifornska-foto-obrazky?rr=2> (1. 11. 2008)
- (2) http://www.fs.fed.us/wildflowers/plant-of-the-week/images/capoppy/calpoppy_lg.jpg (1.11.2008)
- (3) <http://accel98.mettre-put-idata.over-blog.com/0/54/12/95/au-jardin-2/eschscholtzia-03.jpg> (1.11.2008)
- (4) B.Liane, D. Paul, Hans H. Maurer: Studies on the metabolism and toxicological detection of the *Eschscholzia californica* alkaloids californine and protopine in urine gas chromatography-mass spectrometry, ScienceDirect-Journal of Chromatography B 2003
- (5) F. Tome, M. L. Kolombo, L. Caldirolì: A Comparative Investigation on Alkaloid Composition in Different Populations of *Eschscholzia californica* Cham., Phytochemical Analysis 10, 1999, s. 264-267
- (6) J. Bruneton, Pharmacognosy, Intercept Ltd. 1999, 2nd edition, s. 918
- (7) A. Urzua, L. Mendoza: Eschscholtzine-N-oxide from *Eschscholzia Californica*, Journal of Natural Products, Vol 49, No. 5, Sep-Oct 1986, s. 922-923
- (8) A.P. Hanelt, R. Bittner: Mansfred's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops, Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben, Germany, Springer 2001, ISBN 3540410171, s.169
- (9) S. Hejný, B. Slavík, KVĚTENA ČESKÉ SOCIALISTICKÉ REPUBLIKY 1, ACADEMIA Praha, 1988, s. 494
- (10) J. Suchomelová, Disertační práce - HPLC studium kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů ve vybraných rostlinných druzích čeledi Papaveraceae, Brno, 2007
- (11) http://www.herbs2000.com/h_menu/alkaloids.htm (3. 11. 2008)
- (12) (http://www.faf.cuni.cz/apps/daidalea/docs/Compound/2-8-3_Alkaloidy_z_fenylalaninu_a_tyrosinu.pdf) (3. 11. 2008)
- (13) J. Dostál, J. Slavík, Novější poznatky o sanguinarinu a příbuzných alkaloidech, Chemické listy 94, 2000, s. 15 – 20
- (14) <http://www.answers.com/topic/sanguinarine> (4. 11. 2008)

- (15) <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d8/Sanguinarine.png> (4. 11. 2008)
- (16) <http://www.sokoladamov.cz/view.php?cisloclanku=2007020082> (2. 11. 2008)
- (17) R. A. Raffaul: A Handbook of Alkaloids and Alkaloid-Containing Plants, Wiley 1970, ISBN 0471704784
- (18) G. A. Cordell, I. W. Southon, J. Buckingham: Dictionary of Alkaloids, CRC Press, 1989, ISBN 0412249103, s. 151, 180, 215, 216, 254, 417, 418, 670, 879, 926, 939, 940, 1059
- (19) <http://cs.wikipedia.org/wiki/Morfin> (4. 11.2008)
- (20) <http://en.wikipedia.org/wiki/Codeine> (4. 11.2008)
- (21) http://www.vscht.cz/chem_listy/liblice/2003-2001-2007.pdf (4. 11.2008)
- (22) <http://en.wikipedia.org/wiki/Berberine> (4. 11.2008)
- (23) <http://en.wikipedia.org/wiki/Coptisine> (4. 11.2008)
- (24) A. Uryla, L. Mendoza: Eschscholtzine-N-oxide from Eschscholtzia californica, Journal of Natural Products, Vol. 49, No.5, Sep-Oct 1986, s. 922-923
- (25) M. Nečas, J. Dostál, J. Slavík: (+)-Escholinin perchlorate, Acta Crystallographica Section E, Structure Reports Online 2002, ISSN 1600-5368, E58, o1023-o1024
- (26) <http://www.aboca.us/pdf/herbs/poppy.pdf> (4. 11.2008)
- (27) M. Hanus, J. Lafon, M. Mathieu: Double-blind, randomized, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (Crataegus oxyacantha and Eschscholzia californica) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders, Ingentaconnect Current Medical Research and Opinion, Volume 20, Number 1, LibraPharm, 1 January 2004, s. 63-71(9)
- (28) L. Opletal, P. Drašar: Fytochemické metody. 1. Izolace obsahových látek (laboratorní technika), Univerzita Karlova, Praha 1994, ISBN 80-7066-912-8, s. 45, 48, 57, 83, 85, 87, 88, 89, 90, 95, 102, 130, 132

- (29) http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Codein_-_Codeine.svg (4. 11.2008)
- (30) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Sanguinarine_structure.png (4. 11.2008)
- (31) http://www.giftpflanzen.com/urheberrecht_bei_giftpflanzen.com/chelerythrin.gif (4. 11.2008)
- (32) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/59/Berberine_acsv.svg/800px-Berberine_acsv.svg.png (4. 11.2008)
- (33) <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/dc/Cryptopin.svg/120px-Cryptopin.svg.png> (4. 11.2008)
- (34) Obrázek vytvořen za použití aplikace ChEBI
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/advancedSearchForward.do> (4. 11.2008)
- (35) <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=479> (21. 12. 2008)
- (36) <http://www.edukafarm.cz/clanek.php?id=98> (21. 12. 2008)
- (37) MUDr. R. Jirák, CSc., Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby (převzato z časopisu Psychiatrie pro praxi 2002; 2:55-58)
- (38) J. Doležal: Diplomová práce-Biologická aktivita obsahových látek rostlin VIII. Vliv alkaloidů z různých rostlinných taxonů na acetylcholinesterázu, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2008, 65 s.
- (39) E. Stahl: Thin-layer Chromatography: A Laboratory Handbook, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969 (str. 69, 70, 219, 255, 387, 441-443, 873)

